

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin
Klinik für Hämatologie, Onkologie und Immunologie
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Neubauer
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
In Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,
Standort Marburg

**Einfluss einer *gain-of-function*-Mutation im *Plcg2*-Gen
auf eine *Helicobacter felis*-induzierte gastrale
MALT-Lymphom Entwicklung**



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Jennifer Goßmann

aus Kassel

Marburg, 2015

Originaldokument gespeichert auf dem Publikationsserver der
Philipps-Universität Marburg
<http://archiv.ub.uni-marburg.de>



Dieses Werk bzw. Inhalt steht unter einer
Creative Commons
Namensnennung
Keine kommerzielle Nutzung
Weitergabe unter gleichen Bedingungen
3.0 Deutschland Lizenz.

Die vollständige Lizenz finden Sie unter:
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/de/>

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am
16.12.2015

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Helmut Schäfer

Referent: Prof. Dr. Andreas Neubauer

Korreferent: PD Dr. Alexander Visekruna

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Magenlymphome vom MALT-Typ	1
1.1.1 Definition, Klassifizierung und Epidemiologie	1
1.1.2 Morphologie extranodaler Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ	1
1.2 Pathogenese gastraler MALT-Lymphome	3
1.2.1 <i>Helicobacter pylori</i> und gastrale MALT-Lymphome	3
1.2.2 <i>Helicobacter pylori</i> -vermittelte immunologische Reaktionen	7
1.2.3 MALT-Lymphom-spezifische genetische Aberrationen	11
1.3 Klinik und Stadieneinteilung gastraler MALT-Lymphome	13
1.4 Polymorphismen und die Lymphomentstehung	14
1.4.1 Definition	14
1.4.2 Einfluss von Wirtsgen-Polymorphismen auf die gastrale MALT-Lymphom Entstehung	15
1.5 PLC γ 2 und gastrale MALT-Lymphome	16
1.5.1 Funktioneller Aufbau der PLC γ -Isoenzyme	16
1.5.2 Einfluss von PLC γ 2 auf die B-Zell-Entwicklung	18
1.5.3 Überexpression von <i>PLCG2</i> in gastralen MALT-Lymphomen	21
1.6 Tiermodelle	21
1.6.1 <i>H. felis</i> -infizierte Mausmodelle	22
1.6.2 <i>Plcg2</i> ^{Ali5} Mäuse	23
1.7 Hypothese und Zielsetzung	24
2. Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Chemikalien	26
2.1.2 Geräte	27

2.1.3	Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.4	Puffer und Lösungen	29
2.1.5	Kit-Systeme	30
2.1.6	Bakterienstämme und Vektoren.....	30
2.1.6.1	Bakterienstämme	30
2.1.6.2	Vektoren	31
2.1.7	Medien für primäre Zellen und Bakterien	31
2.1.7.1	Medien der Zellkultur	31
2.1.7.2	Nährmedien und Agarplatten.....	31
2.1.7.3	Einfriermedien.....	31
2.1.8	Oligonukleotide.....	31
2.1.9	Antikörper und Proteine	33
2.1.10	Enzyme	34
2.1.11	Molekulargewichtsstandards.....	35
2.1.12	Computerprogramme und externe Serviceeinheiten.....	35
2.2	Methoden.....	35
2.2.1	Kultivierung und Charakterisierung von <i>Helicobacter felis</i>	35
2.2.1.1	Anzucht, Vermehrung und Kryokonservierung	36
2.2.1.2	Charakterisierung	36
2.2.1.3	Messung der Bakteriendichte	38
2.2.2	Versuchstiere	38
2.2.2.1	Haltung, Zucht und Genotypisierung der Mäuse	38
2.2.2.2	Infektion der Mäuse	39
2.2.2.3	Versuchsablauf	39
2.2.2.4	Blutentnahme aus der Schwanzvene	42
2.2.2.5	Maus-Magnetresonanztomographie.....	42
2.2.2.6	Sektion der Mäuse und Organentnahme	42
2.2.2.7	Nachweis von <i>Helicobacter felis</i> in den infizierten Mäusen	43
2.2.3	Histopathologische Methoden.....	43
2.2.3.1	Beschichtung der Objektträger	43
2.2.3.2	Anfertigung von Gewebeschnitten.....	44
2.2.3.2.1	Paraffineinbettung.....	44
2.2.3.2.2	Herstellung histologischer Schnitte	45
2.2.3.3	Histologische Färbemethoden.....	45
2.2.3.4	Immunhistologische Färbemethoden	46

2.2.3.4.1	Immunhistologie von CD3 und Foxp3 im Milzgewebe	47
2.2.4	Zellbiologische Methoden.....	47
2.2.4.1	Kultivierung von primären Zellen	47
2.2.4.2	Isolierung von primären Zellen der Milz und mesenterialen Lymphknoten	48
2.2.4.3	Bestimmung der Zellzahl	48
2.2.4.4	Magnetische Zellaufreinigung von murinen B-Zellen.....	48
2.2.4.5	<i>In vitro</i> -Stimulation von primären B-Zellen der Milz und primären mesenterialen Lymphknotenzellen	49
2.2.4.6	Zellproliferationsassay.....	50
2.2.4.6.1	BrdU-Assay.....	50
2.2.5	Molekularbiologische Methoden.....	51
2.2.5.1	DNA-Isolation	51
2.2.5.1.1	DNA-Isolation aus Gewebe	51
2.2.5.1.2	DNA-Isolation aus FFPE-Gewebe	51
2.2.5.1.3	DNA-Isolation aus <i>H. felis</i>	52
2.2.5.2	RNA-Isolation aus murinem Blut	52
2.2.5.3	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	53
2.2.5.4	Reverse Transkription.....	53
2.2.5.5	Qualitative Polymerase-Kettenreaktion	54
2.2.5.5.1	Genotypisierungs-PCR	54
2.2.5.6	Quantitative Real-Time PCR	55
2.2.5.7	<i>H. felis</i> 16S rDNA basierte PCR	56
2.2.5.7.1	<i>H. felis</i> 16S rDNA-Nachweis mittels qualitativer PCR.....	56
2.2.5.7.2	Einschätzung der <i>H. felis</i> Kolonisationsrate mittels quantitativer PCR.....	57
2.2.5.8	RT ² Profiler PCR Array.....	57
2.2.5.9	Agarose-Gelelektrophorese	58
2.2.5.10	Klonierung und Transformation	59
2.2.5.11	Plasmidpräparation und Sequenzierung	60
2.2.6	Proteinbiochemische und immunologische Methoden.....	61
2.2.6.1	Proteinisolation aus <i>Helicobacter felis</i>	61
2.2.6.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	62
2.2.6.3	Immunglobulin-ELISA	62
2.2.6.4	<i>H. felis</i> -spezifischer Immunglobulin-ELISA.....	63
2.2.6.5	Durchflusszytometrie (FACS)	64
2.2.7	Statistische Analysen.....	65

3. Ergebnisse	67
3.1 Charakterisierung der <i>Ali5</i> -Mäuse	67
3.1.1 Genotypisierung	67
3.2 Einfluss der <i>Plcg2</i> <i>gain-of-function</i> -Mutation auf eine <i>H. felis</i> -induzierte gastrale MALT-Lymphom Entwicklung	68
3.2.1 Beweis einer <i>H. felis</i> -Infektion in den infizierten Mäusen	68
3.2.2 Bildgebende Diagnostik zur Beurteilung einer gastralen MALT-Lymphom Entwicklung	69
3.2.3 <i>H. felis</i> -infizierte <i>Plcg2</i> ^{<i>Ali5/+</i>} Mäuse entwickeln seltener gastrale MALT-Lymphome	70
3.2.4 Untersuchung der <i>H. felis</i> -Kolonisationsrate in infizierten <i>Plcg2</i> ^{<i>Ali5/+</i>} und WT Mäusen	73
3.2.5 Steigerung der MALT-Lymphom Entwicklung nach <i>H. felis</i> -Reinfektion	74
3.3 Herunterregulation proinflammatorischer Gene in <i>H. felis</i> -infizierten <i>Plcg2</i> ^{<i>Ali5/+</i>} Mäusen	75
3.3.1 Expressionslevel von IFN γ und IL-1 α im Langzeit-Follow-up	78
3.4 Untersuchung der B-Zell-Funktion in <i>Plcg2</i> ^{<i>Ali5/+</i>} Mäusen	80
3.5 Verminderte <i>H. felis</i> -spezifische Antikörperantwort in <i>Plcg2</i> ^{<i>Ali5/+</i>} Mäusen	83
3.6 Korrelation zwischen der Anzahl regulatorischer T-Zellen und der Entwicklung gastraler MALT-Lymphome	84
4. Diskussion	87
4.1 Die <i>gain-of-function</i> -Mutation des <i>Plcg2</i> -Gens schützt, entgegen der initialen Hypothese, vor der Entwicklung gastraler MALT Lymphome	88
4.2 Geringere Suszeptibilität von <i>Plcg2</i> ^{<i>Ali5/+</i>} Mäusen auf eine <i>H. felis</i> -induzierte gastrale MALT-Lymphom Entwicklung ist nicht das Ergebnis eines B-Zell-Defekts	90
4.3 Regulatorische T-Zellen in <i>Plcg2</i> ^{<i>Ali5/+</i>} Mäusen wirken protektiv auf die MALT-Lymphom Entwicklung	91
4.4 Hypothese: Eine hohe Anzahl von Tregs hemmt die <i>Helicobacter</i> -induzierte chronische Inflammation und schützt in diesem Fall vor der Entwicklung des malignen Lymphoms	95
4.5 Schlussfolgerung und Ausblick	96

5. Zusammenfassung.....	98
6. Abstract	100
7. Literaturverzeichnis	101
8. Anhang	116
9. Veröffentlichungen und Kongressbeiträge.....	119
10. Tabellarischer Lebenslauf	120
11. Verzeichnis der akademischen Lehrer	121
12. Danksagung.....	122
13. Ehrenwörtliche Erklärung	124

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT).	2
Abbildung 2: Klinischer Verlauf einer <i>H. pylori</i> -Infektion.....	7
Abbildung 3: MALT-Lymphom Pathogenese.....	12
Abbildung 4: Strukturelle Domänenorganisation der PLC γ -Isoenzyme.....	17
Abbildung 5: Die Rolle von PLC γ 2 in der BCR Signaltransduktion.....	19
Abbildung 6: Gram-Färbung von <i>Helicobacter felis</i>	38
Abbildung 7: Genotypisierungs-PCR von <i>Ali5</i> -Mäusen.	68
Abbildung 8: <i>Helicobacter felis</i> -Nachweis im Magen.....	69
Abbildung 9: MRT des Abdomens von zwei <i>H. felis</i> -infizierten Mäusen.	70
Abbildung 10: Histologie und Immunhistochemie gastraler MALT-Lymphom Entwicklung.	71
Abbildung 11: Bestimmung der <i>H. felis</i> Kolonisationsrate.	74
Abbildung 12: Herunterregulation von IFN γ und IL-1 α in infizierten <i>Plcg2</i> ^{<i>Ali5/+</i>} Mäusen.....	79
Abbildung 13: BrdU-Proliferationsassay von B-Zellen infizierter und uninfizierter Mäuse... ..	81
Abbildung 14: IgG1-Klassenwechsel von B-Zellen <i>in vitro</i>	82
Abbildung 15: Totale und <i>H. felis</i> -spezifische Antikörpertiter infizierter und uninfizierter Mäuse.....	84
Abbildung 16: Erhöhte Foxp3 ⁺ Treg Zahl im Milzgewebe uninfizierter <i>Plcg2</i> ^{<i>Ali5/+</i>} Mäuse.....	86
Abbildung 17: Layout des RT ² Profiler Array (96 Well-Platte).	116
Abbildung 18: <i>Plcg2</i> -Nukleotidsequenz.	116
Abbildung 19: Immunhistologische CD3 und Foxp3 Färbung von murinem Milzgewebe... ..	117
Abbildung 20: FACS Analyse von CD4 ⁺ /CD25 ⁺ /Foxp3 ⁺ Tregs und CD73 ⁺ Tregs der Milz.....	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auszug von <i>H. pylori</i> -Pathogenitätsfaktoren.....	5
Tabelle 2: Ann-Arbor-Stadieneinteilung nach Musshoff und Radaszkiewicz	14
Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide für die RT- und quantitative PCR.....	32
Tabelle 4: Verwendete Genotypisierungs-Oligonukleotide.....	32
Tabelle 5: Verwendete Sequenzier-Oligonukleotide.	32
Tabelle 6: Antikörper und rekombinante Proteine.....	33
Tabelle 7: <i>H. felis</i> -infizierte Mäuse der Gruppen 1-3.....	40
Tabelle 8: <i>H. felis</i> -infizierte Mäuse der Gruppe 4.	40
Tabelle 9: <i>H. felis</i> -infizierte Mäuse der Gruppe 5.	41
Tabelle 10: Programm der qualitativen PCR.	54
Tabelle 11: Programm der quantitativen Real-time PCR.	56
Tabelle 12: Programm des RT ² Profiler Arrays.	58
Tabelle 13: Histopathologische Befunde <i>H. felis</i> -infizierter <i>Plcg2</i> ^{Ali5/+} und WT Mäuse.	72
Tabelle 14: Histopathologische Befunde uninfizierter Kontrollmäuse.	73
Tabelle 15: Histopathologische Befunde <i>H. felis</i> -reinfizierter <i>Plcg2</i> ^{Ali5/+} und WT Mäuse.	75
Tabelle 16: Regulation proinflammatorischer Gene infizierter und uninfizierter Mäuse.	76
Tabelle 17: Proinflammatorisches Zytokinprofil von <i>Plcg2</i> ^{Ali5/+} und WT Mäusen (uninfiziert oder 6 Monate nach Infektion) eingeteilt in Genotyp- und Infektionsstatus.....	77
Tabelle 18: Vergleich der PCR Array und qPCR Daten im Genotyp- und Infektionsstatus. .	118

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Ali5	<i>Abnormal limb 5</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i> , Hirn-Herz-Bouillon
bp	Basenpaare
BrdU	Bromdeoxyuridin (5-Bromo-2'-deoxyuridin)
BSA	<i>Bovines Serumalbumin</i> , Rinderserumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
Ct	Cycle-threshold
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DLBCL	<i>diffuse large B-cell lymphoma</i> , diffus großzelliges B-Zell-Lymphom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> , enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ENU	<i>N-ethyl-N-nitrosourea</i> , N-Ethyl-N-nitrosoharnstoff
EtOH	Ethanol
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FFPE	<i>formalin-fixed, paraffin-embedded</i> , Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
Foxp3	Forkhead Box P3

Abkürzungsverzeichnis

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
H&E	Hämatoxylin-Eosin
H. felis	<i>Helicobacter felis</i>
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
HCl	Salzsäure
Helicobacter spp.	<i>Helicobacter species</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
IFN γ	Interferon gamma
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
LB-Medium	<i>lysogeny broth medium</i>
LED	lymphoepitheliale Destruktion
LEL	lymphoepitheliale Läsion
LPS	Lipopolysaccharid
LSAB	<i>Labeled (Strept-)Avidin-Biotin-</i>
LU	Labor Unit
MACS	<i>magnetic cell sorting</i> , magnetische Zellaufreinigung
MALT	<i>mucosa-associated lymphoid tissue</i> , Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MNCs	<i>mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen
MRT	Magnetresonanztomograph
MZ	Marginalzone
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NF- κ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NTC	<i>no template control</i> , PCR Negativkontrolle
OD	optische Dichte
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung

Abkürzungsverzeichnis

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PLC	Phospholipase C
POD	Peroxidase
qPCR	quantitative PCR
rDNA	ribosomale DNA
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardabweichung vom Mittelwert
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TESAP	3-(Triethoxysilyl)-propylamin
T _m	Schmelztemperatur
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
Tregs	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen-sorbitan-monolaurat, Polysorbat 20
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
Well	Vertiefung einer Mikrotiterplatte
WT	Wildtyp
g	gravity, Erdbeschleunigung

1. Einleitung

1.1 Magenlymphome vom MALT-Typ

1.1.1 Definition, Klassifizierung und Epidemiologie

Zum ersten Mal beschrieben Isaacson und Wright in den frühen 1980er Jahren das sogenannte MALT-Konzept, bei dem sich Lymphome aus sekundär erworbenem Schleimhaut- bzw. Mukosa-assoziiertem lymphatischem Gewebe (engl.: *mucosa-associated lymphoid tissue*; MALT) entwickeln, deren histologische Besonderheiten vor allem dem organisierten MALT der Peyer'schen Plaques im terminalen Ileum ähneln (Isaacson and Wright, 1983a; Isaacson and Wright, 1984). Magenlymphome vom MALT-Typ gehören zur Gruppe der indolenten Non-Hodgkin-Lymphome (NHL), die eine Krebserkrankung des lymphatischen Systems darstellen. Sie werden auch als extranodale Marginalzonen (MZ) B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ bezeichnet, da sie primär außerhalb des Lymphknotens, aus B-Zellen der Marginalzone entstehen. In den folgenden Jahren wurden weitere Marginalzonen-Lymphome beschrieben, die 1994 in nodale, splenische und extranodale MZL vom MALT-Typ als eigene Entitäten in die „Revised European-American Lymphoma (R.E.A.L.) Klassifikation“ und später in die WHO-Klassifikation aufgenommen wurden (Campo et al., 2011; Harris et al., 1994). 25-30 % aller NHL haben einen extranodalen Ursprung (d'Amore et al., 1991; Krol et al., 2003; Newton et al., 1997). Der größte Teil davon entsteht im Gastrointestinaltrakt und hier insbesondere im Magen (Freeman et al., 1972; Morgner et al., 2000). Primär gastrale MALT-Lymphome sind insgesamt aber eher seltene Erkrankungen und treten vor allem im mittleren und höheren Lebensalter auf. Die Inzidenz der Magenlymphome in Deutschland beträgt 0,7-0,8 Fälle je 100.000 Personen pro Jahr (Ullrich et al., 2002).

1.1.2 Morphologie extranodaler Marginalzonen B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ

Extranodale MZ B-Zell-Lymphome vom MALT-Typ haben ihren Ursprung in der Marginalzone reaktiver Sekundärfollikel, die analog den organisierten Lymphfollikeln der Peyer'schen Plaques des Dünndarms sind. Morphologisch bestehen diese Follikel aus einem

Keimzentrum mit aktivierten B-Lymphozyten, welches von einer follikulären Mantelzone aus dicht gedrängten naiven B-Zellen umgeben ist. In der Peripherie befindet sich die Marginalzone mit B-Lymphozyten Gedächtniszellen (Abbildung 1).

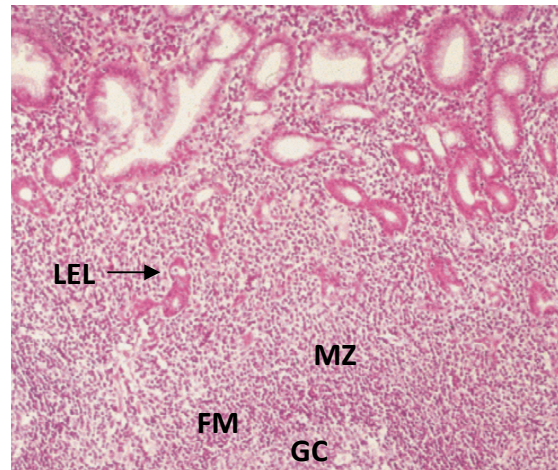


Abbildung 1: Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT).

GC = Keimzentrum (engl.: *germinal centre*); FM = follikuläre Mantelzone (engl.: *follicular mantle*); MZ = Marginalzone (engl.: *marginal zone*); LEL = lymphoepitheliale Läsion (engl.: *lymphoepithelial lesion*) (Du and Isaacson, 2002)

Die Lymphomzellen sind als kleine bis mittelgroße Lymphozyten erkennbar und werden, aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit den Zentrozyten des Follikelzentrums, als zentrozyten-ähnliche Zellen beschrieben. Die Zellen können morphologisch wie Monozyten imponieren. Eingestreute blastenartige Zellen liegen in MALT-Lymphomen nur vereinzelt vor. Ein dichteres Auftreten dieser Zellen deutet auf eine sekundäre Transformation zu einem diffusen großzelligen B-Zell-Lymphom (engl.: *diffuse large B-cell lymphoma*; DLBCL) hin (Cavalli et al., 2001).

Mit Fortschreiten der Krankheit und der klonalen Expansion von MZ B-Zellen dehnt sich schließlich das MALT-Lymphom von der Marginalzone in die angrenzenden Follikelzwischenräume aus und kolonisiert weitere Follikel. Das charakteristische Merkmal eines MALT-Lymphoms ist die Infiltration in das umgebende Drüsenepithel und die damit verbundene Verdrängung und Destruktion der Drüsenstruktur. Eine Invasion von mindestens drei neoplastischen B-Lymphozyten in das Epithel wird als lymphoepitheliale Läsion (LEL) bezeichnet, die komplette Zerstörung derer als lymphoepitheliale Destruktion (LED) (Isaacson and Wright, 1983a; Stolte et al., 2002).

1.2 Pathogenese gastraler MALT-Lymphome

Das MALT ist ein wichtiges Element des Immunsystems und Teil der sekundären lymphatischen Organe, wie Milz und Lymphknoten. Im Gegensatz zu den primären lymphatischen Organen (Knochenmark und Thymus), in denen die Bildung und Reifung von B- und T-Lymphozyten erfolgt, schützt das sekundäre MALT die Haut sowie Oberflächen des Bronchial- und Gastrointestinaltrakts vor Krankheitserregern und initiiert die Immunreaktion durch Antigenkontakt (Cerroni et al., 1997; Janeway et al., 2001; Sagaert et al., 2007). Eine gesunde Magenschleimhaut besitzt im Vergleich zum physiologischen MALT der Peyer'schen Plaques des Dünndarms kein primär lymphatisches Gewebe. Voraussetzung für die Entwicklung von gastralen MALT-Lymphomen ist das sekundär erworbene lymphatische Gewebe vom MALT-Typ, das auf dem Boden einer persistierenden Antigenstimulation entsteht (Du and Isaacson, 2002). Allerdings können als Folge von Autoimmunerkrankungen auch MALT-Lymphome außerhalb des Magens in den Speicheldrüsen oder der Schilddrüse bei Patienten mit Sjögren-Syndrom oder Hashimoto-Thyreoiditis entstehen (Hyjek and Isaacson, 1988; Hyjek et al., 1988). Der bedeutendste Risikofaktor für die Entstehung des gastralen MALT-Lymphoms ist das Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), welches im weiteren Verlauf näher beschrieben wird.

1.2.1 *Helicobacter pylori* und gastrale MALT-Lymphome

Der „Magenkeim“ *Helicobacter pylori* ist ein gramnegatives, mikroaerophiles, spiralförmiges Bakterium mit einem Durchmesser von 0,5-0,9 µm und einer Länge von 2-4 µm (Owen, 1998). Erstmals im Jahr 1983 gelang den beiden australischen Wissenschaftlern Robin Warren und Barry Marshall die *in vitro* Kultivierung des Bakteriums aus humanen Magenbiopsien. Zugleich stellten sie eine Verbindung zwischen dem Bakterium und der Entwicklung einer Gastritis her (Marshall and Warren, 1984). Für diese Entdeckung erhielten die beiden Wissenschaftler 2005 den Nobelpreis für Medizin.

Ende der 80er Jahre wurde ein Zusammenhang zwischen den erworbenen sekundären lymphoiden Aggregaten der gastralen Mukosa und der chronischen Infektion mit *H. pylori* festgestellt (Stolte and Eidt, 1989; Wyatt and Rathbone, 1988). In 92-98 % aller gastralen MALT-Lymphome konnte darüber hinaus das Bakterium *H. pylori* nachgewiesen werden, womit eine assoziative Beziehung zwischen dieser bakteriellen Infektion und der Entstehung eines MALT-Lymphoms gezeigt werden konnte (Parsonnet et al., 1991; Stolte,

1992; Wotherspoon et al., 1991). Hussell et al. konnten schließlich den direkten Einfluss einer *H. pylori*-Infektion auf die Entstehung von gastralen MALT-Lymphomen mit Hilfe von *in vitro* Experimenten untermauern. Es konnte gezeigt werden, dass *H. pylori* nicht unmittelbar die Proliferation von B-Zellen stimuliert, sondern dass die Entwicklung eines gastralen MALT-Lymphoms abhängig von der Stimulation *H. pylori*-Antigen aktivierter Tumor-infiltrierter T-Zellen ist (Hussell et al., 1996; Hussell et al., 1993). *H. pylori*-spezifische T-Zellen stehen über die co-stimulierenden Moleküle CD40 und CD40L mit den B-Zellen in Kontakt, wodurch diese aktiviert und indirekt zur Proliferation angeregt werden (Greiner et al., 1997).

Stolte und Eidt sowie Wotherspoon und Kollegen konnten zeitgleich im Jahr 1993 einen direkten Zusammenhang zwischen einer durch *H. pylori*-induzierten Entzündungsreaktion und der Entstehung eines gastralen MALT-Lymphoms nachweisen. Sie erzielten in MALT-Lymphom-Patienten durch Eradikation des Keims mittels Antibiotikatherapie eine Remission des Lymphoms (Stolte and Eidt, 1993; Wotherspoon et al., 1993), wobei seine Eliminierung, aufgrund des *H. pylori*-induzierten T-Zell-abhängigen Lymphomwachstums, meistens nur in der frühen Phase der Erkrankung zur Heilung führt (siehe Kapitel 1.3). Unsere Gruppe leitete die weltweit größte *H. pylori*-Therapiestudie mit dem längsten Follow-up für Patienten mit einem MALT-Lymphom (Bayerdörffer et al., 1995; Morgner et al., 2001; Neubauer et al., 1997; Thiede et al., 2001; Wündisch et al., 2012; Wündisch et al., 2005). 80 % der Patienten im frühen Stadium der Erkrankung zeigten nach einer 75-monatigen bzw. 122-monatigen medianen Beobachtungszeit eine komplette histologische Remission, die in den meisten Fällen auch nach zehn Jahren anhält (Wündisch et al., 2012; Wündisch et al., 2005). Weitere Studien konnten ebenfalls durch Heilung der *Helicobacter*-Infektion eine Regression des Lymphoms bestätigen (Montalban et al., 2005; Pinotti et al., 1997; Wu et al., 2004).

Weltweit ist die *H. pylori*-Kolonisation des Magens eine der häufigsten bakteriellen Infektionen, denn mehr als die Hälfte der Weltbevölkerung ist mit dem Bakterium infiziert. Die Prävalenz der Infektion ist, in Abhängigkeit von den hygienischen Bedingungen, geographischen Variationen unterlegen und reicht von 20-50 % in Industrieländern bis zu über 80 % in Entwicklungsländern (Bauer and Meyer, 2011; Frenck and Clemens, 2003; Suerbaum and Michetti, 2002). Eine Infektion mit *H. pylori* erfolgt meist im Kindesalter auf oral-oralem oder fäkal-oralem Weg und kann unbehandelt über Jahre im Magen persistieren (Blaser and Parsonnet, 1994; Megraud, 1995; Rothenbacher et al., 1999).

Eine Reihe von Faktoren ermöglicht es dem Bakterium im sauren Milieu des Magens zu überleben und diese ökologische Nische zu besiedeln. Stammspezifische Virulenzfaktoren von *Helicobacter*-Spezies sind vor allen Dingen für die Kolonisation, Persistenz und Pathogenität des Keims überaus wichtig (Stein, 2006). Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die *H. pylori*-spezifischen Pathogenitätsfaktoren.

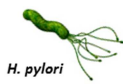
Tabelle 1: Auszug von *H. pylori*-Pathogenitätsfaktoren.

Pathogenitätsfaktoren	Funktion
Kolonisationsfaktoren:	
Flagellen	Beweglichkeit des Bakteriums
Urease	Pufferung der Magensäure
Persistenzfaktoren:	
Adhäsine	Anheftung an die Magenmukosa
Katalase, Superoxiddismutase	Schutz des Bakteriums vor oxidativen Schäden
Mimikry von Lewis-Antigenen	Langzeitpersistenz
Gewebeschädigende Faktoren:	
Vakuolisierendes Zytotoxin A (VacA)	Zytotoxin/Zellschädigung - Vakuolisierung der Zellen
Neutrophil Activating Protein (NapA)	Aktivierung neutrophiler Granulozyten
<i>cag</i> -Pathogenitätsinsel	kodiert für Proteine des T4SS und für CagA
Zytotoxin-assoziiertes Gen A (CagA)	Effektorprotein

Diese Pathogenitätsfaktoren manipulieren letztlich die Immunantwort des Wirts und sind für eine Langzeit-Besiedlung des Magens von großer Bedeutung (Israel and Peek, 2006). Ein bedeutender gewebeschädigender Faktor ist das vakuolisierende Zytotoxin A (VacA), welches nicht von jeder *Helicobacter*-Spezies exprimiert wird. VacA verursacht in den Magenepithelzellen eine Vakuolisierung des Zytoplasmas und ruft dadurch eine Schädigung der Zellen hervor. Zudem wird davon berichtet, dass VacA Apoptose in Wirtszellen induziert und die Proliferation von T-Zellen inhibiert (Gebert et al., 2003; Suerbaum and Michetti, 2002). Möglicherweise ist *H. pylori* aufgrund dessen in der Lage, die adaptive Immunantwort des Wirtes zu umgehen und eine chronische Infektion hervorzurufen (Rieder et al., 2005). Der wichtigste Virulenzfaktor ist die *cag*-Pathogenitätsinsel, die u. a. für das CagA Protein kodiert. CagA-positive Stämme sind bekannt für ihre starke Immunogenität und werden mit einer stärkeren Immunantwort und Entzündung in Verbindung gebracht. Einige Gene der *cag*-Pathogenitätsinsel kodieren für ein Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS), welches die Translokation von CagA in die Wirtszelle

gewährleistet. Dort spielt es sowohl phosphoryliert als auch unphosphoryliert eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionswege (Brandt et al., 2005; Kwok et al., 2007; Stein et al., 2000). Dies führt letzten Endes zur Infiltration der unter normalen Umständen in der Mukosa nicht anzutreffenden Immunzellen (siehe Kapitel 1.2.2). CagA-positive *Helicobacter*-Spezies werden aufgrund ihrer hohen Pathogenität viel häufiger mit Folgekrankheiten, wie Ulzera, Karzinome und auch MALT-Lymphome assoziiert als CagA-negative Stämme (Miehlke et al., 2000; Rudi et al., 2000; Schmausser et al., 2000).

Wie bereits beschrieben, kann *H. pylori* über Jahrzehnte im Magen persistieren. Eine Infektion führt immer zu einer chronischen Gastritis, die in den meisten Fällen allerdings asymptomatisch verläuft (Bergman and D'Elios, 2010). Inzwischen wird *H. pylori* als wesentlicher Risikofaktor mit einer Reihe verschiedener gastroduodenaler sowie auch anderer Erkrankungen, wie z. B. der Immunthrombozytopenie, assoziiert (Frydman et al., 2015; Malnick et al., 2014). Der klinische Krankheitsverlauf einer *H. pylori*-Infektion ist dabei abhängig von verschiedenen Faktoren, die sowohl das Bakterium als auch der Wirt vermitteln. Das Zusammenspiel der bereits beschriebenen keimspezifischen Pathogenitätsfaktoren sowie der individuellen Immunantwort und der genetischen Faktoren des Wirts haben Einfluss auf das Ausmaß und die Lokalisation der Erkrankung (Abbildung 2). Dementsprechend zeigen Patienten mit hoher Magensäuresekretion eine Antrum-prädominante Gastritis. In diesen Fällen verhindert die erhöhte Säureproduktion eine Kolonisation des Erregers im Magenkorpus, was sich im weiteren Verlauf zu einem Geschwür des Dünndarms entwickeln kann. Im Gegensatz dazu sind Patienten mit niedriger Säureproduktion prädisponiert, eine Korpus-prädominante Gastritis zu entwickeln, die wiederum zu Magengeschwüren, intestinaler Metaplasie, Dysplasie und in 2 % der Fälle zu Magenkarzinomen führen kann (Conteduca et al., 2013). Aufgrund der Erkenntnis, dass eine *H. pylori*-Infektion eine Entstehung von Magentumoren fördert, wurde das Bakterium 1994 von der WHO als Karzinogen der Klasse 1 eingestuft (IARC, 1994). Durch eine Infektion mit *H. pylori* kann nach Jahrzehnten im Magen Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe entstehen, aus dem in weniger als 1 % der infizierten Personen ein MALT-Lymphom hervorgeht (Conteduca et al., 2013; Parsonnet and Isaacson, 2004).



Eine *H. pylori* Infektion findet normalerweise in der frühen Kindheit statt. Persistiert das Bakterium im Magen des Wirts, führt dies nach Jahren immer zu einer chronischen Gastritis. Der weitere Krankheitsverlauf ist dabei abhängig von verschiedenen Wirts- und Pathogenitätsfaktoren. Weniger als 1 % der infizierten Personen entwickelt im Laufe der Jahrzehnte gastrale MALT-Lymphome, die somit eine Minderheit der gastroduodenalen Erkrankungen darstellen (verändert nach Conteduca et al., 2013).

Bei einer *H. pylori*-Infektion wird zwischen einer angeborenen Immunantwort und einer adaptiven oder erworbenen Immunantwort unterschieden. Bei der angeborenen Immunantwort handelt es sich um einen unspezifischen Prozess, der zur Infiltration von Immunzellen (neutrophile Granulozyten, Makrophagen etc.) führt, wodurch zunächst eine entzündliche Reaktion der Magenschleimhaut, eine akute Gastritis, und durch die Persistenz des Keims eine chronisch aktive Gastritis hervorgerufen wird.

7

Lipoproteine, aber auch Nukleinsäuren), werden durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, den „*pattern recognition receptors*“ (PRRs), erkannt (Kumar et al., 2011; Mogensen, 2009). Diese PRRs können zum einen in löslicher Form, zum anderen intrazellulär oder membrangebunden auf Immunzellen vorkommen. Zu Letzteren gehört u. a. die Familie der Toll-ähnlichen Rezeptoren (engl.: *toll-like receptor*, TLR) (Akira et al., 2006; Basset et al., 2003; Kumar et al., 2011; Mogensen, 2009). So erkennt z. B. TLR2 Lipoproteine gramnegativer Bakterien (Lien et al., 1999) und TLR4 Lipopolysaccharide (LPS) (Chow et al., 1999). Allerdings ist *Helicobacter*-spezifisches LPS im Gegensatz zu LPS anderer gramnegativer Bakterien weniger endotoxisch und immunogen, wodurch es kaum eine proinflammatorische Immunantwort vermitteln kann (Muotiala et al., 1992). Zudem ist auch TLR5 nicht in der Lage, *H. pylori*-Flagellin zu erkennen (Lee et al., 2003). Anhand dieser Erkenntnisse wird nochmals ersichtlich, dass *H. pylori* zahlreiche Mechanismen entwickelt hat, der angeborenen Immunantwort zu entkommen.

Neben den bereits beschriebenen Pathogenitätsfaktoren ist insbesondere das CagA Protein für die Induktion der angeborenen Immunantwort von großem Interesse. Nach der Bindung von *H. pylori* an die Epithelzelle kann das CagA Effektorprotein mit Hilfe seines Sekretionsapparats (T4SS) in die Wirtszelle injiziert werden. CagA besitzt am C-terminalen Ende Tyrosinphosphatreste, welche durch Tyrosinkinasen der Src-Familie erkannt und phosphoryliert werden. Vielfältige Signaltransduktionsprozesse können dadurch in Gang gesetzt werden (Blaser and Atherton, 2004). Es kommt zu einer Reorganisation des Zytoskeletts und zur morphologischen Veränderung der Zellen, die als sogenannter *hummingbird*-Phänotyp beschrieben wird, und eine gesteigerte Zellelongation und Motilität zur Folge hat (Su et al., 2003). Die Interaktion von phosphoryliertem CagA mit der Tyrosinphosphatase SHP-2 (engl.: *Src-homology 2 domaincontaining tyrosine phosphatase*) führt zur Aktivierung des ERK (engl.: *extracellular signal-regulated kinase*)/MAPK (engl.: *mitogen-activated protein kinase*)-Signalwegs und zu einer Verstärkung der Zellelongation (Blaser and Atherton, 2004; Higashi et al., 2004; Higashi et al., 2002). Des Weiteren führt unphosphoryliertes CagA zur Zerstörung der Zell-Zell Verbindung (*tight junctions* und *adherens junctions*), wodurch die epitheliale Barriere der Zelle aufgebrochen wird (Posselt et al., 2013). Ein weiteres Zielmolekül von unphosphoryliertem CagA ist das Adaptermolekül Grb-2 (engl.: *growth factor receptor-bound protein 2*), welches die Ras (engl.: *rat sarcoma protein*)/Raf (engl.: *v-raf murine sarcoma viral oncogene homology*)/MEK (engl.: *MAPK/ERK kinase*)/ERK-Signalkaskade aktiviert und dadurch einen erheblichen Einfluss auf die

Zellproliferation, Inflammation, Zellelongation und Zellmotilität nimmt (Mimuro et al., 2002). Neben dem Ras/Raf/MEK/ERK-Signalweg führt CagA phosphorylierungsunabhängig zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NFAT (engl.: *nuclear factor of activated T cells*) und NF- κ B (engl.: *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) sowie zur NF- κ B-induzierten Sekretion proinflammatorischer Zytokine (Brandt et al., 2005; Hatakeyama, 2009).

Abgesehen von CagA, welches in der Wirtszelle die Zellmorphologie und Polarität reguliert, sezerniert *H. pylori* über T4SS Fragmente von Peptidoglykanen in die Magenepithelzelle des Wirts. Diese spezifisch-konservierten Motive in der Zellwand gramnegativer Bakterien induzieren, über NOD1 (engl.: *nucleotide binding and oligomerization domain 1*), einen intrazellulären Rezeptor, die Aktivierung von NF- κ B und letzten Endes die Transkription proinflammatorischer Gene, u. a. von IL-8 (Posselt et al., 2013; Viala et al., 2004). Die *H. pylori*-vermittelte NF- κ B-Aktivierung besitzt sowohl eine anti-apoptotische Wirkung (siehe Kapitel 1.5.2), induziert aber auch eine inflammatorische Immunantwort (Backert and König, 2005). Die durch Epithelzellen sezernierten proinflammatorischen Zytokine und Chemokine, insbesondere die Sekretion von IL-8, führen zu einer lokalen polymorphen Immunreaktion der Mukosa. Eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen sowie eine starke Entzündungsreaktion sind die Folge. Diese Immunzellen sind wiederum selbst in der Lage entzündungsfördernde Zytokine, wie z.B. IL-1, IL-6 und TNF- α (Tumornekrosefaktor- α), zu bilden (Wilson and Crabtree, 2007).

Die erworbene Immunantwort führt schließlich zur Entwicklung *H. pylori*-spezifischer Antikörper und T-Zellen. Eine entscheidende Verbindung von angeborenem und erworbenem Immunsystem stellen antigenpräsentierende Zellen (u. a. dendritische Zellen und Makrophagen) dar. Diese erkennen mit Hilfe ihrer PRRs Keime, deren Antigene wiederum auf MHC-II Molekülen (engl.: *major histocompatibility complex II*, Haupthistokompatibilitätskomplex) an CD4⁺ T-Helferzellen (Th-Zellen) präsentiert werden (Basset et al., 2003). *H. pylori*-spezifische T-Zellen zeigen einen prädominanten Th1-Phänotyp, der vor allem durch die Produktion von IFN γ (Interferon γ), TNF- α und IL-12 gekennzeichnet ist (D'Elis et al., 1997), nicht aber durch IL-4 (Sommer et al., 1998). Die Sekretion von IL-12 und IL-23, durch *H. pylori* NapA stimulierte Neutrophile und Monozyten, führt ebenfalls zu einer Th-1 Antwort (Amedei et al., 2006).

Darüber hinaus spielt eine Gruppe von CD4⁺ T-Zellen, sogenannte regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen, Tregs), eine zentrale Rolle innerhalb einer bakteriellen Infektion (Belkaid et al.,

2002; Kaparakis et al., 2006; Lundgren et al., 2005; Raghavan et al., 2003). Diese Zellen sind insbesondere für ihre immunsuppressive Wirkung und für die Regulation der Selbsttoleranz bekannt, wodurch sie in gesunden Individuen eine Entstehung von Autoimmunerkrankungen verhindern können (Braga et al., 2012; Mills, 2004). Die Mehrheit der CD4⁺ Tregs entsteht aus dem Thymus und ist somit natürlichen Ursprungs (nTregs). Sie umfassen ca. 5-10 % aller peripheren CD4⁺ T-Zellen. Natürliche Tregs exprimieren das Zelloberflächenmolekül CD25 (engl.: *IL-2 receptor α chain*, IL-2R α) sowie intrazellulär den Transkriptionsfaktor Foxp3 (engl.: *forhead box protein 3*), welcher für ihre Entwicklung und Funktionalität verantwortlich ist (Yamaguchi et al., 2011). Neben nTregs können induzierbare Tregs (iTregs), als Antwort auf einen spezifischen Antigenkontakt in Abhängigkeit von dendritischen Zellen, in der Peripherie aus naiven CD4⁺ T-Zellen entstehen (Chen et al., 2003; Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009; Jonuleit et al., 2001; Liang et al., 2005; Mahnke et al., 2002; Ohkura et al., 2013; Piccirillo and Shevach, 2004). Natürliche Tregs unterdrücken die T-Zell-vermittelte Immunantwort durch Zellkontakt-abhängige Mechanismen, wohingegen die zu den iTregs gehörenden Tr1 (engl.: *T regulatory cell*) und Th3-Zellen ihr suppressive Wirkung über die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-10 und TGF- β (engl.: *transforming growth factor- β*) ausüben (Jonuleit and Schmitt, 2003; Sakaguchi, 2005; von Boehmer, 2005). Die Akkumulation Foxp3⁺ Tregs steht mit einer bakteriellen Infektion in engem Zusammenhang, bei der infolge der Infektion nTregs zur Expansion angeregt und naive T-Zellen zu iTregs umgewandelt werden (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). Auch Craig et al. konnten eine erhöhte Anzahl Tumor-infiltrierter CD4⁺ T-Zellen als CD25⁺/Foxp3⁺ Tregs in *Helicobacter*-induzierten MALT-Lymphomen identifizieren (Craig et al., 2010).

Die Th1-dominierende *Helicobacter*-vermittelte Immunantwort löst die Proliferation und Aktivierung von Makrophagen und die klonale Expansion und Differenzierung von B-Zellen aus (Wilson and Crabtree, 2007). Aufgrund des persistierenden Keims im Magen und der daraus hervorgehenden chronischen Gastritis produzieren B-Zellen infolgedessen *Helicobacter*-spezifische IgM, IgA und IgG Antikörper, wobei IgM nur kurze Zeit nach der Infektion mit *H. pylori* nachweisbar ist (Nurgalieva et al., 2005). IgA sowie die IgG Antikörper sind sowohl im infizierten Magengewebe als auch im Serum detektierbar (Wilson and Crabtree, 2007) und können aufgrund von *H. pylori*-induzierten Autoimmunprozessen zu zusätzlichen Gewebeschäden führen (Ernst et al., 2006). So kann molekulares Mimikry zwischen *H. pylori* LPS und den Lewis X und Y Blutgruppenantigenen gastraler Epithelzellen,

welche wiederum auf gastralen H^+ , K^+ -ATPasen (engl.: *adenosine triphosphatase*) exprimiert sind, zu einer verstärkten inflammatorischen Antwort und Zellschädigung führen (Amedei et al., 2003; D'Elios et al., 2004; Vandenbroucke-Grauls and Appelmelk, 1998). Somit exprimieren gastrale MALT-Lymphome, die aus einer chronisch bakteriellen *Helicobacter*-Infektion entstehen, ebenfalls autoimmunreaktive Antikörper (Faller and Kirchner, 2000), womit die Autoimmunität für die Pathogenese von MALT-Lymphomen wichtig zu sein scheint.

1.2.3 MALT-Lymphom-spezifische genetische Aberrationen

Als Antwort auf eine *H. pylori*-Infektion und der damit verbundenen inflammatorischen Reaktion infiltrieren neutrophile Granulozyten in die gastrale Mukosa, welche durch die Bildung von DNA-schädigenden reaktiven Sauerstoffradikalen eine maligne Transformation der B-Zellen begünstigen. Somit kann die Entwicklung von MALT-Lymphomen von verschiedenen chromosomalen Aberrationen begleitet werden. Es wurde bereits eine Reihe von MALT-Lymphom-spezifischen genetischen Abnormalitäten beschrieben. Dabei handelt es sich u. a. um verschiedene Aneuploidien, wie den Trisomien 3, 7, 12 und 18, sowie um Mutationen im FAS-Gen, im Tumorsuppressorgen p53 und in den Genen für zwei Cyclin-abhängige Kinase-Inhibitoren p15 und p16 (negative Regulatoren des Zellzyklus). Des Weiteren wurden mehrere Translokationen, wie die t(11;18)(q21;q21), t(1;14)(p22;p32), t(14;18)(q32;q21) und t(3;14)(p13;q32), in MALT-Lymphomen beschrieben (Du and Isaacson, 2002; Du et al., 1995; Isaacson and Du, 2004; Sagaert et al., 2007). Eine Hauptrolle unter den bekannten genetischen Abnormalitäten spielt die Translokation t(11;18)(q21;q21), die mit einer Häufigkeit von bis zu 50 % in MALT-Lymphomen auftritt (Auer et al., 1997; Dierlamm et al., 1999). Diese Translokation führt über die Fusion der rearrangierten Gene *API2* (11q21) (engl.: *inhibitor of apoptosis*) und *MALT1* (18q21) (engl.: *mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1*) zur konstitutiven Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs (Cavalli et al., 2001; Inagaki, 2007). *API2* gehört zur Familie der Apoptoseinhibitoren und supprimiert den natürlichen Zelltod (Apoptose) durch Hemmung der Kaspasen 3, 7 und 9 (Inagaki, 2007; Isaacson and Du, 2004). *MALT1* hingegen wurde als eine kaspaseähnliche Protease „Parakaspase“ identifiziert (Uren et al., 2000) und spielt bei der NF- κ B Aktivierung eine wesentliche Rolle (siehe Kapitel 1.5.2). Die Translokation t(1;14)(p22;p32) wurde im Jahr 1990 von Wotherspoon et al. zum ersten Mal

beschrieben und ist mit einer Häufigkeit von bis zu 5 % nur selten in MALT-Lymphomen vertreten (Wotherspoon et al., 1990). Neben der Translokation t(11;18)(q21;q21) verstärkt t(1;14)(p22;p32) die NF-κB Aktivierung, indem es das *BCL10*-Gen (engl.: *B-cell lymphoma/leukemia 10*) unter die Kontrolle des Enhancer-Elements Ig-schwere Ketten-Gens setzt und *BCL10* dadurch in MALT-Lymphomen überexprimiert (Willis et al., 1999; Zhang et al., 1999). *BCL10* kann dann wiederum mit MALT1 und CARD11 (engl.: *Caspase recruitment domain-containing protein 11*) einen Komplex bilden und zu einer Erhöhung von NF-κB im Nukleus führen (Cavalli et al., 2001; Niemann and Wiestner, 2013).

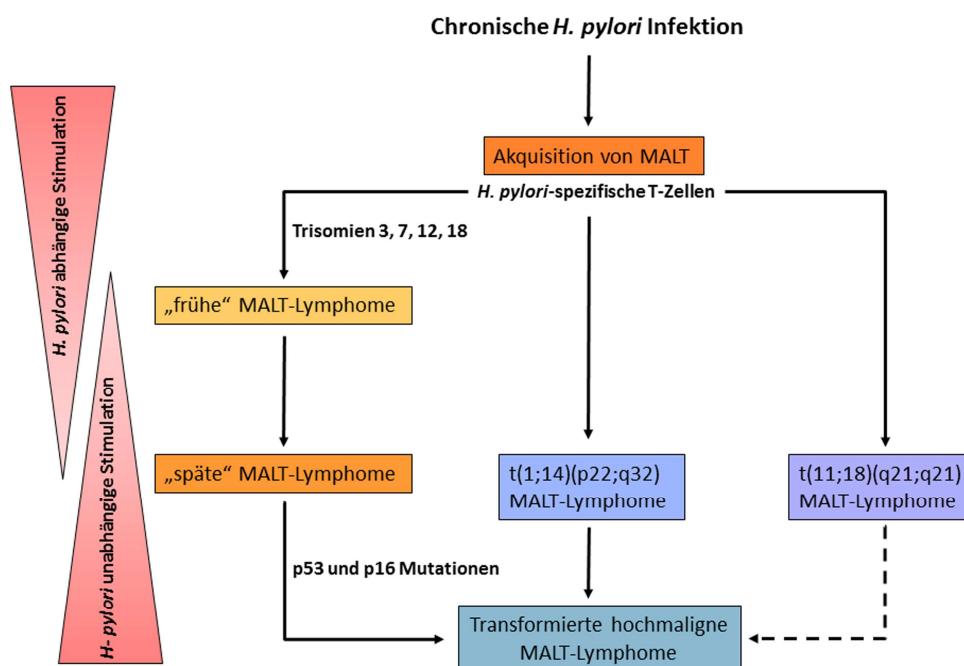


Abbildung 3: MALT-Lymphom Pathogenese.

Als Folge einer persistierenden *H. pylori*-Infektion resultiert MALT, und bei wenigen Menschen dann ein daraus sich entwickelndes MALT-Lymphom, welches in diesem Stadium mit Hilfe einer Antibiotikatherapie reversibel ist. Durch das Auftreten von genetischen Aberrationen im weiteren Verlauf entzieht sich das Lymphom dem Antigenstimulus und wird autonom. Lymphome mit der Translokation t(11;18)(q21;q21) erlangen ein autonomes Wachstum und sprechen somit schlechter auf eine *H. pylori*-Eradikation an. In seltenen Fällen entwickeln sie sich zu transformierten MALT-Lymphomen. Lymphome mit der Translokation t(1;14)(p22;q32) sind möglicherweise *H. pylori*-unabhängig und können einer Transformation in ein aggressives MALT-Lymphom unterliegen. MALT-Lymphome ohne chromosomale Translokationen können allerdings verschiedene Trisomien tragen (Trisomie 3, 7, 12 oder 18). In der frühen Phase sind diese Lymphome *H. pylori*-abhängig und sprechen auf eine Eradikationstherapie an. Im weiteren Erkrankungsverlauf können darüber hinaus Mutationen im p53- oder p16-Gen auftreten, die schließlich in einer aggressiven Transformation resultieren (Du and Isaacson, 2002; Isaacson and Du, 2004; Sagaert et al., 2010; Sakai et al., 2005).

Die Entwicklung von gastralen MALT-Lymphomen ist ein mehrstufiger Prozess, der anfangs auf dem Boden einer *Helicobacter*-Infektion beruht und im weiteren Verlauf auf maligne Transformationen von Zellen zurückzuführen ist (Abbildung 3). Eine chronische *H. pylori*-Infektion führt zur Ausbildung von lymphatischen Infiltraten vom MALT-Typ in der gastralen Mukosa. Als Folge von direkten (antigenabhängig) und indirekten (*H. pylori*-spezifische T-Zellen) Stimulationen, kommt es zur klonalen Expansion primär inflammatorischer B-Zellen und zur Akquisition von den bereits beschriebenen genetischen Abnormalitäten (Du and Isaacson, 2002). Im Gegensatz zur „frühen“ MALT-Lymphom Entwicklung, dessen Wachstum antigenabhängig ist und durch eine Eradikationstherapie des Bakteriums geheilt werden kann, wachsen „späte“ MALT-Lymphome eher autonom bzw. unabhängig von antigenen Stimuli und sprechen weniger auf Antibiotikatherapie an (Du and Isaacson, 2002; Isaacson and Du, 2004). In einigen Fällen entwickeln sich aus der Transformation dieser MALT-Lymphome aggressive Lymphome, die als DLBCL (engl.: *diffuse large B-cell lymphoma*, diffus großzelliges B-Zell-Lymphom) beschrieben und klassifiziert werden (Cavalli et al., 2001; Inagaki, 2007).

1.3 Klinik und Stadieneinteilung gastraler MALT-Lymphome

Die klinische Einschätzung des Lymphomstadiums ist für die Therapieplanung von großer Bedeutung. Empfohlen wird hierbei die nach Musshoff modifizierte Ann-Arbor-Klassifikation (Musshoff, 1977), die letztlich durch Radaszkiewicz überarbeitet und in MALT-Lymphome im Stadium E I 1 (Lymphom auf Mukosa und Submukosa beschränkt) und E I 2 (Infiltration über Submukosa hinaus) differenziert wurde (Tabelle 2) (Radaszkiewicz et al., 1992).

Da gastrale MALT-Lymphome mit einem langen ortsständigen Wachstum zu den indolenten Erkrankungen zählen, werden sie - trotz unspezifischer Symptomatik wie z. B. Magenbeschwerden, Erbrechen oder Gewichtsabnahme - durch eine Magenspiegelung in frühen Stadien (E I und E II) diagnostiziert. Die initiale Therapie nach Wahl bei diesen Fällen ist die antibiotische Keimeradikation von *H. pylori*, die mit sehr hohem Erfolg zur Remission führt (siehe Kapitel 1.2.1). Auch Patienten mit *H. pylori*-negativen MALT-Lymphomen oder Patienten im Stadium E III oder E IV können einer Eradikationstherapie unterzogen werden. Stellt sich keine Verbesserung des Lymphoms ein (sowohl makroskopisch als auch

histologisch) wird eine Strahlentherapie und/oder Chemotherapie empfohlen (Fischbach, 2013).

Tabelle 2: Ann-Arbor-Stadieneinteilung nach Musshoff und Radaszkiewicz

Stadium	Definition
E I 1	uni- oder multilokuläres Magenlymphom ohne Lymphknotenbeteiligung, beschränkt auf Mukosa und Submukosa
E I 2	uni- oder multilokuläres Magenlymphom ohne Lymphknotenbeteiligung, mit Infiltration der Muscularis propria, Subserosa und/oder Serosa oder eines benachbarten Organs
E II 1	uni- oder multilokuläres Magenlymphom jeder Infiltrationstiefe mit Befall regionaler Lymphknoten
E II 2	uni- oder multilokuläres Magenlymphom jeder Infiltrationstiefe mit Befall regionaler Lymphknoten und infradiaphragmatischer Lymphknoten und Infiltration in ein weiteres nicht-lymphatisches benachbartes Organ oder ein unterhalb des Zwerchfells lokalisierten Organs
E III	uni- oder multilokuläres Magenlymphom jeder Infiltrationstiefe mit Lymphknotenbefall oberhalb und unterhalb des Zwerchfells sowie eines weiteren lokalisierten Organbefalls, der oberhalb des Zwerchfells liegen kann
E IV	uni- oder multilokuläres Magenlymphom ohne oder mit Lymphknotenbeteiligung und diffusem oder disseminiertem Befall eines oder mehrerer extragastraler Organe

Suffix E: extranodaler Befall

1.4 Polymorphismen und die Lymphomentstehung

1.4.1 Definition

Als Polymorphismus bezeichnet man die Genvariabilität an einem Genort innerhalb einer Population. Kennzeichnend ist, dass das Auftreten dieser Sequenzvariation über 1 % in der Bevölkerung liegen muss, da ansonsten von einer Mutation gesprochen wird (Lander et al., 2001).

Polymorphismen lassen sich in drei Varianten einteilen. Insertionen und Deletionen beschreiben dabei eine Variante und sind durch den Einbau oder den Verlust von mindestens einem Nukleotid gekennzeichnet. Eine weitere Form ist die Multiplikation, welche die Verdopplung oder Vervielfachung eines Gens definiert. Einzelnukleotidpolymorphismen (engl.: *Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP) beschreiben die häufigste Variante, die den Austausch eines Nukleotids im Gen beschreiben (Lander et al., 2001). Diese können an verschiedenen Genloci auftreten, wobei ein Vorkommen in den

kodierenden Genabschnitten zu einem Aminosäureaustausch im Protein führen kann. Solch ein Austausch ist allerdings nicht immer der Fall, da einige Aminosäuren von mehreren Codons (Basentripletts) kodiert werden. Kommt es doch zu einem Aminosäureaustausch, führt dies zu einer Veränderung der Proteinstruktur, was weitreichende Folgen nach sich ziehen kann. Aufgrund potentiell entstehender veränderter Genprodukte, zählen Polymorphismen zu den genetischen Risikofaktoren, die eng mit der Krebsentstehung assoziiert werden (Skibola et al., 2007).

1.4.2 Einfluss von Wirtsgen-Polymorphismen auf die gastrale MALT-Lymphom Entstehung

Wie bereits beschrieben, spielen neben der Virulenz von *Helicobacter*-Spezies verschiedene Wirtsmerkmale bei der Lymphomentstehung eine mögliche Rolle. Eine Reihe von Publikationen konnte zeigen, dass Wirtsgen-Polymorphismen die Sensibilität gegenüber einer *H. pylori*-Infektion beeinflussen können. So führen Polymorphismen in Genen, die für die Immunantwort und Entzündungsreaktion einer *H. pylori*-Infektion verantwortlich sind, zu einer gesteigerten inflammatorischen Antwort und konsekutiv zu einer Neigung zu gastralen MALT-Lymphomen (Cheng et al., 2006; Rollinson et al., 2003).

TNF- α , welches zu den proinflammatorischen Zytokinen gehört, steht in engem Zusammenhang mit *H. pylori*-assoziierten gastroduodenalen Krankheiten. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit TNF-Promoter Genpolymorphismen ein erhöhtes Risiko besitzen, an NHL bzw. NHL-Subtypen - wie MALT-Lymphomen - zu erkranken (Bel Hadj Jrad et al., 2007; Rothman et al., 2006; Wu et al., 2004). Diese genetischen Polymorphismen führen zu einem höheren Level an TNF- α , welches in einer verstärkten Aktivierung von NF- κ B resultiert und folglich eine anti-apoptotische Wirkung auf B-Zellen ausübt (Karin and Greten, 2005) (siehe Kapitel 1.5.2.).

Auch CTLA4- (engl.: *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*, zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4), IL-1- und GST T1- (engl.: *Glutathione-S-transferase theta 1*) Polymorphismen werden mit der Entstehung von MALT-Lymphomen in Verbindung gebracht (Cheng et al., 2006; Rollinson et al., 2003). Bei einer *H. pylori*-induzierten Entzündungsreaktion führt u. a. die Entstehung von freien Radikalen zu einer irreversiblen Schädigung der Magenepithelzellen. GST T1 ist ein Enzym, welches den Organismus vor oxidativem Stress schützt und somit eine antioxidative Schutzfunktion ausübt. Deletionspolymorphismen im

GST T1-Gen führen zum Verlust dieses Enzyms und sind mit einem erhöhten Risiko für NHL assoziiert (Skibola et al., 2007). Sowohl Polymorphismen im IL-1RN- (engl.: *Interleukin-1 receptor antagonist*) als auch im GST T1-Gen werden mit der Entwicklung von gastralen MALT-Lymphomen in Verbindung gebracht (Rollinson et al., 2003). Cheng et al. (2006) konnten zeigen, dass Menschen mit Polymorphismen im CTLA4-Gen eine Suszeptibilität zu gastralen MALT-Lymphomen aufweisen (Cheng et al., 2006). CTLA4 wird von aktivierten T-Zellen exprimiert und ist ein negativer Regulator der T-Zell Aktivierung (McCoy and Le Gros, 1999). Es ist bekannt, dass die Entwicklung von MALT-Lymphomen abhängig von *H. pylori*-spezifischen T-Zellen ist (Hussell et al., 1996), wobei somit Polymorphismen in Genen, die für die Regulation von T-Zellen verantwortlich sind, eng mit der MALT-Lymphomgenese in Verbindung stehen.

1.5 PLC γ 2 und gastrale MALT-Lymphome

1.5.1 Funktioneller Aufbau der PLC γ -Isoenzyme

Phosphoinositid-spezifische Phospholipasen C (PLC) sind Enzyme, die die Hydrolyse des Membranphospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdInsP₂) katalysieren und, durch die Bildung der zwei *second messenger* Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP₃) und Diacylglycerol (DAG), für eine Reihe von unterschiedlichen Signaltransduktionsprozessen verantwortlich sind. Insgesamt sind 13 humane PLC-Isoformen bekannt, die sich in sechs verschiedene Familien einteilen lassen: PLC β (β 1-4), PLC γ (γ 1 und 2), PLC δ (δ 1, δ 3-4), PLC ϵ (ϵ 1), PLC ζ (ζ 1), PLC η (η 1 und 2) (Bunney and Katan, 2011; Suh et al., 2008).

Die Aktivierung von PLC γ -Isoenzymen erfolgt über mehrere intrazelluläre Signalprozesse, die durch zahlreiche Protein-Tyrosin-Kinasen (PTK) vermittelt werden (Hikida et al., 2003). Eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung aller PLC-Familien spielt die sogenannte „Kerndomäne“, ein konservierter Bereich, der sich beginnend am N-terminalen Ende aus einer PH- (engl.: *pleckstrin homology*) Domäne, vier EF-Hand Motiven, der katalytischen „TIM (Triosephosphat-Isomerase)-barrel“ Domäne und abschließend einer C-terminalen C2-Domäne zusammensetzt (siehe Abbildung 4) (Bunney and Katan, 2011; Katan, 1998). Die katalytische Domäne besteht aus zwei hochkonservierten Regionen, der X- und Y-Box, dessen aktives Zentrum von hydrophoben Aminosäuren umgeben ist. Charakteristisch für

die PLC γ -Isoenzyme 1 und 2 ist eine negativ-geladene Region zwischen den beiden X- und Y-Hälften (*X/Y-linker* Region) (Gresset et al., 2010), die sich aus einer zweiten „split“ PH-(spPH) Domäne kennzeichnet, die wiederum durch zwei SH2- (engl.: *Src homology 2*) Domänen und einer SH3 Domäne geteilt ist. Dieser Bereich wird PLC γ -spezifische-Domäne (engl.: *PLC γ -specific array*, γ -SA) genannt. Die X- und Y-Box sowie die *X/Y-linker* Region werden als „TIM barrel“ bezeichnet, da diese Region eine fassähnliche Struktur aufweist (Bunney and Katan, 2011).

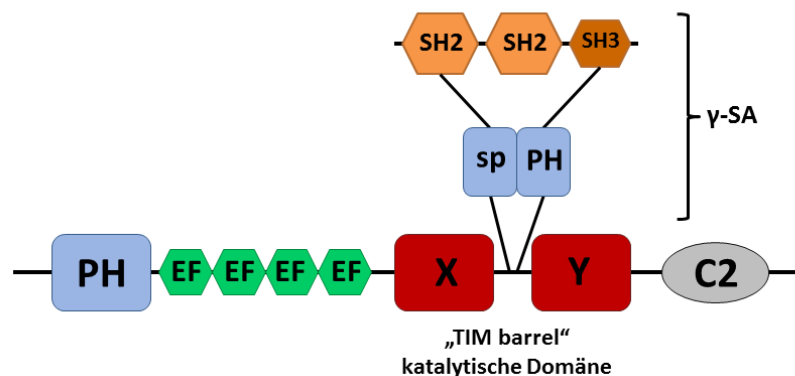


Abbildung 4: Strukturelle Domänenorganisation der PLC γ -Isoenzyme.

Die Domänenstruktur der PLC γ -Isoenzyme 1 und 2 besteht am N-terminalen Ende aus einer PH-Domäne (blau), vier EF-Hand Motiven (grün) und einer katalytischen „TIM barrel“ Domäne (rot), die sich in eine X- und Y-Domäne einteilt, und einer C-terminalen C2-Domäne (grau). Innerhalb der katalytischen Domäne, zwischen der X- und Y-Box bzw. in der *X/Y-linker* Region, befindet sich eine weitere spPH-Domäne (blau), zwei SH2- (orange) und eine SH3-Domäne (braun), die als γ -SA zusammengefasst werden. Dort befindet sich das aktive Zentrum der PLC γ , welches erst nach SH2-Domänen-vermittelter Aktivierung des Enzyms seine Funktion ausüben und sein Substrat in die zwei signalweiterleitenden *second messenger* umsetzen kann. EF = *EF-hand motif*, Calcium-bindendes Motiv; PH = *pleckstrin homology*; SH = *Src homology*; spPH = *split PH*; γ -SA = *PLC γ -specific array*; PLC γ -spezifische-Domäne (modifiziert nach Bunney & Katan 2011 und Katan 1998).

SH2-Domänen spielen eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung von PLC γ -Isoenzymen. Sie interagieren mit phosphorylierten Tyrosinresten und rekrutieren daraufhin an aktivierte Rezeptoren. Die PH-Domäne ist hingegen für die Bindung von Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PtdInsP $_3$) an die innere Plasmamembran von Bedeutung (Katan, 1998; Wang et al., 2000). Es ist bekannt, dass die *X/Y-linker* Region eine autoinhibitorische Funktion besitzt, wodurch das aktive Zentrum innerhalb dieser Region nicht frei zugänglich ist.

Infolge der SH2-Domänen-vermittelten Aktivierung kommt es zu einer Konformationsänderung der γ -SA Struktur, womit PtdInsP₂ freien Zugang zum aktiven Zentrum erhält und schlussendlich in InsP₃ und DAG katalysiert werden kann (Hicks et al., 2008; Katan et al., 2003). Zusätzlich ist das aktive Zentrum innerhalb der katalytischen Domäne von hydrophoben Aminosäuren umgeben. Diese sogenannte hydrophobe Bindungsstelle (engl.: *hydrophobic ridge loop 3*, HRL3) im PLC γ 2-Gen wirkt unter normalen Umständen an der Membraninteraktion von PLC γ 2 mit und hemmt dessen Enzymaktivität. Von Bedeutung ist dabei die negative Ladung der *X/Y-linker* Region, womit eine langanhaltende Interaktion mit der ebenfalls negativ-geladenen Plasmamembran verhindert werden kann (Ellis et al., 1998).

Das PLC γ 2-Isoenzym spielt eine überaus wichtige Rolle bei der Regulation der B-Zell-Proliferation und -Differenzierung und wird im weiteren Verlauf näher erläutert.

1.5.2 Einfluss von PLC γ 2 auf die B-Zell-Entwicklung

Ein Schlüsselmolekül für die Regulation des Immunsystems stellt die Phospholipase C gamma 2 (PLC γ 2) dar, die durch verschiedene hämatopoetische Zellen, wie u. a. B-Lymphozyten, Mastzellen, NK-Zellen (engl.: *natural-killer cells*) und Makrophagen, exprimiert wird (Suh et al., 2008). PLC γ 2 spielt eine wichtige Rolle bei der B-Zell-Rezeptor (engl.: *B-cell receptor*, BCR)-vermittelten Signalkaskade und ist somit für das Überleben und die Proliferation von B-Zellen von essentieller Bedeutung (Abbildung 5).

Der BCR setzt sich aus einem membranständigen Immunglobulin (mIg) zusammen, welches nicht-kovalent über zwei Disulfidbrücken-verbundene Heterodimere, CD79A (Ig α) und CD79B (Ig β), assoziiert ist. Die zytosolischen Domänen von Ig α und Ig β werden als ITAMS (engl.: *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*, Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivierungssequenzen) bezeichnet und sind für die BCR-vermittelte Signalweiterleitung von großer Bedeutung (Packard and Cambier, 2013). Nach Antigenbindung an den BCR werden die zytoplasmatischen Tyrosinkinasen SYK (engl.: *Spleen tyrosine kinase*) und LYN (engl.: *Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase*) aktiviert. Mitglieder der Src-Kinase Familie, insbesondere LYN aber auch FYN (engl.: *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase*), BLK (engl.: *B-lymphocyte tyrosine kinase*) oder LCK (engl.: *lymphocyte-specific protein tyrosine kinase*), phosphorylieren wiederum die intrazellulären ITAMS der Ig α /Ig β Heterodimere an ihren Tyrosinresten, wodurch SYK rekrutiert und aktiviert wird. SYK ist nun

in der Lage die Phosphorylierung des Adapterproteins BLNK (engl.: *B-cell linker*) zu vermitteln, welches wiederum für die BCR-vermittelte PLC γ 2 Aktivierung von großer Bedeutung ist und seine phosphorylierten Tyrosinreste als Bindungsstellen für PLC γ 2 - durch Bindung an ihre SH2-Domänen - und BTK (*Bruton's tyrosine kinase*) bereitstellt (Marshall et al., 2000; Nielsen and Leslie, 2005; Niirö and Clark, 2002; Packard and Cambier, 2013).

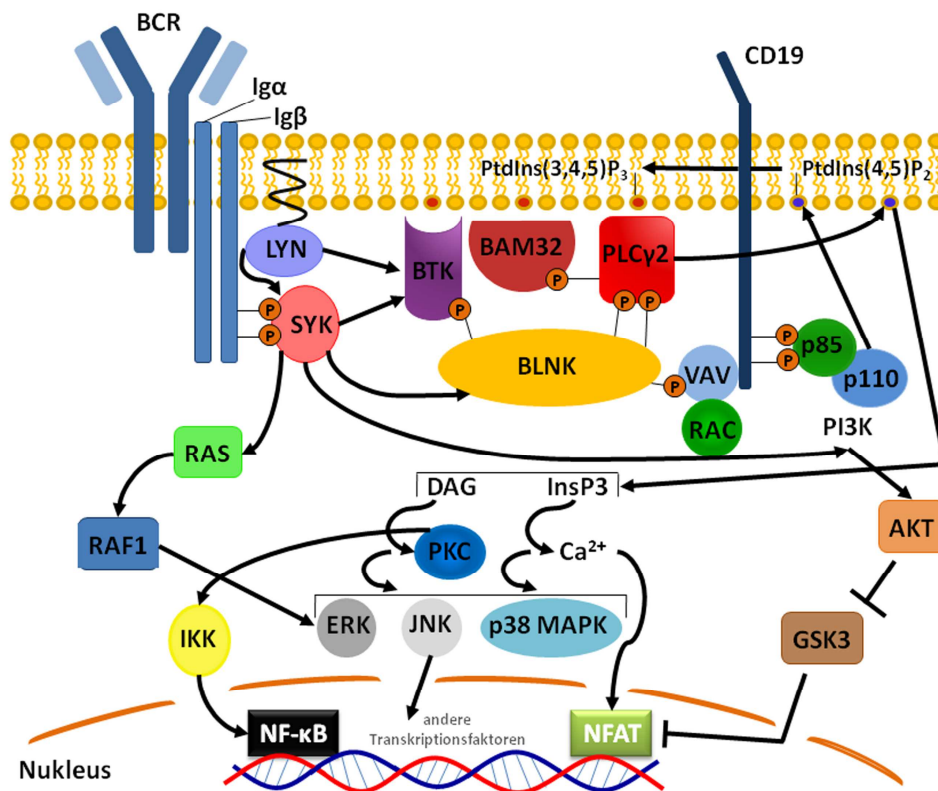


Abbildung 5: Die Rolle von PLC γ 2 in der BCR Signaltransduktion.

Die Phospholipase C γ 2 (PLC γ 2) ist entscheidend an der B-Zell-Rezeptor (BCR)-vermittelten Signalweiterleitung beteiligt. Die Antigenbindung an den BCR führt über eine Reihe von aktivierten Tyrosinkinasen zur Phosphorylierung und Aktivierung der PLC γ 2. Diese ist schließlich in der Lage, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PtdInsP₂) in die zwei *second messenger* Inositol-1,4,5-trisphosphat (InsP₃) und Diacylglycerol (DAG) zu hydrolysieren, die wiederum eine Reihe von Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren aktivieren. PLC γ 2 ist somit insbesondere für den NF- κ B Signalweg von Bedeutung (verändert nach Niirö and Clark 2002).

Parallel dazu ist ein weiterer Signalweg für die positive Regulierung von PLC γ 2 entscheidend: Die PI3K (engl.: *phosphoinositide 3-kinase*) phosphoryliert PtdInsP₂ zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdInsP₃). BTK geht schließlich eine Verbindung

mit der im Plasmamembran vorkommenden PtdInsP_3 ein, wird phosphoryliert und führt letzten Endes zur Aktivierung von PLC γ 2 (Marshall et al., 2000; Scharenberg et al., 2007). Angesichts des bereits vorliegenden BLNK-PLC γ 2-BTK-Komplexes wird die PLC γ 2 in die Nähe ihres Substrats - PtdInsP_2 - gebracht, woraufhin die *second messenger* DAG und InsP_3 katalysiert werden können (Niiro and Clark, 2002; Scharenberg et al., 2007). InsP_3 induziert durch Bindung an seinen Rezeptor im endoplasmatischen Retikulum (ER) die Freisetzung von intrazellulärem Calcium (Ca^{2+} -Ionen), wodurch weitere Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran einen extrazellulären Ca^{2+} -Fluss in die Zelle ermöglichen (Scharenberg et al., 2007). Der Anstieg von Ca^{2+} ist für verschiedene physiologische Prozesse in der Zelle unerlässlich und führt über das Ca^{2+} -abhängige Enzym Calcineurin zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT und zur Translokation in den Zellkern (Marshall et al., 2000). Sowohl der Ca^{2+} -Einstrom als auch die durch DAG aktivierten PKC (engl.: *protein kinase C*)-Isoformen können wiederum zur Aktivierung signalweiterleitender Kinasen der MAPK-Familie, wie ERK, JNK (engl.: *c-Jun NH2-terminal kinase*) und der p38 MAPK-Kinase führen, welche für die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren verantwortlich sind (Niiro and Clark, 2002). Insbesondere die PKC β aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B in B-Zellen. Die Phosphorylierung von CARD11 durch die PKC β führt zur Bildung eines CARD11-MALT1-BCL10 Komplexes, der den I κ B Kinase Komplex (IKK), bestehend aus zwei katalytischen Untereinheiten (IKK α und IKK β) und einer regulatorischen Untereinheit (IKK γ oder NEMO), aktiviert. Daraufhin werden die an NF- κ B gebundenen und inhibitorischen κ B-Proteine (I κ B) phosphoryliert, ubiquitiniert und proteasomal abgebaut (Cavalli et al., 2001; Karin and Greten, 2005; Thome, 2004). Das im Zytoplasma freigesetzte NF- κ B Dimer kann schließlich in den Nukleus translozieren und Gene aktivieren, die für die Proliferation, das Zellüberleben und eine akute Inflamationsreaktion verantwortlich sind (Karin and Greten, 2005; Nielsen and Leslie, 2005).

Anhand dieser Erkenntnisse stellt die Aktivierung der PLC γ 2 einen bedeutenden Zwischenschritt im NF- κ B-Signalweg dar (Niiro and Clark, 2002), dessen Überaktivierung in einer Reihe von Tumorerkrankungen beschrieben wurde (Karin, 2009; Niemann and Wiestner, 2013).

1.5.3 Überexpression von *PLCG2* in gastralen MALT-Lymphomen

Der BCR-Signalweg ist für die Entwicklung von B-Zellen unerlässlich. Störungen innerhalb der BCR-vermittelten Signaltransduktion werden daher, als Folge eines konstitutiv aberrant aktivierten NF- κ B-Signalwegs und seiner anti-apoptotischen Wirkung auf B-Zellen (Karin, 2009), häufig mit der B-Zell-Lymphomgenese in Verbindung gebracht (Young and Staudt, 2013).

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte das Transkriptomprofil von 21 humanen *Helicobacter*-induzierten gastralen MALT-Lymphomen im Vergleich zur chronischen Gastritis desselben Patienten mittels cDNA Microarray (Huynh et al., 2008). Neben einer Hochregulation von Oberflächenantigenen inflammatorischer Zellen, wie *CD40*, *CD53*, *CD83* und *CD86*, fanden wir eine Reihe von Genen, die im NF- κ B Signalweg eine wichtige Rolle spielen. *CD79B*, *LYN* und *PLCG2* zeigten eine signifikante Überexpression in humanen MALT-Lymphomen (Huynh et al., 2008), die NF- κ B signalaufwärts (*up-stream*) von MALT1 und BCL10 regulieren (Thome, 2004).

Dass die PLC γ 2 für die BCR-vermittelte Signalweiterleitung verantwortlich ist, konnte in anderen humanen B-Zell-Lymphomen nachgewiesen werden. Marafioti und Kollegen zeigten durch immunhistologische Färbungen eine starke PLC γ 2-Expression in primär mediastinalen B-Zell-Lymphomen, DLBCLs sowie in lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphomen (Marafioti et al., 2005). Klassische Hodgkin-Lymphome waren hingegen PLC γ 2 negativ (Marafioti et al., 2004). Ebenfalls konnte eine erhöhte Expression von PLC γ 2 in verschiedenen Lymphom-Entitäten (MALT-Lymphom, follikulären-Lymphom, Mantelzell-Lymphom, Burkitt-Lymphom, DLBCL) nachgewiesen werden. Insbesondere ist eine erhöhte PLC γ 2-Expression bei Patienten mit DLBCL prognostisch günstig (Huynh et al., 2015).

Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass PLC γ 2 nicht nur in physiologischen B-Zellen, sondern auch in Lymphomzellen eine überaus wichtige Rolle für das Zellüberleben spielt.

1.6 Tiermodelle

Für die Erforschung *Helicobacter*-assoziierter Krankheitsprozesse sind Tiermodelle von größter Bedeutung. Nicht-humane Primaten, Katzen, Hunde, sowie eine Reihe von Nagetieren, wie Mäuse und Ratten, werden für die Untersuchung verschiedener

Krankheitsbilder herangezogen. Insbesondere Mäuse werden angesichts ihrer hohen Anzahl an Nachkommen und relativ niedrigen Tierhaltungskosten sehr häufig für *Helicobacter*-Infektionsversuche eingesetzt (Nedrud, 1999). Dies liegt nicht zuletzt an der beachtlichen Vielfalt an Inzuchtstämmen und der großen Diversität an transgenen- und Knockout-Mäusen, die hinsichtlich ihrer heterogenen Immunantworten, im Zusammenspiel mit verschiedenen *Helicobacter*-Spezies, eine mehr oder wenige starke Entzündungsreaktion zeigen (Lee et al., 1997).

1.6.1 *H. felis*-infizierte Mausmodelle

Helicobacter felis ist ein naher Verwandter des humanen gastrointestinalen Pathogens *H. pylori*. Es ist ein 5 bis 7,5 µm langes, helikales Bakterium mit 10-17 bipolaren Flagellen (Owen, 1998). Im Jahr 1988 wurde *H. felis* erstmals aus der Katze isoliert (Lee et al., 1988). Heute weiß man, dass die Hauptwirte dieser *Helicobacter*-Spezies neben Katzen auch Hunde darstellen, wobei ebenso Menschen mit dem Erreger infiziert werden können (Owen, 1998).

Ein gut etabliertes Modell zur Untersuchung *H. pylori*-assoziierter Erkrankungen des Menschen ist das *H. felis*-infizierte Mausmodell, welches der humanen Infektion mit *H. pylori* und den daraus resultierenden Krankheitsbildern ähnelt (Lee et al., 1990). Klinische und histopathologische Charakteristika humaner MALT-Lymphome können durch eine *Helicobacter*-Langzeitinfektion von BALB/c Mäusen nachgestellt werden. Dieses Mausmodell liefert dabei ein einzigartiges System, den kompletten Krankheitsprozess, von der frühen Immunantwort bis zur Entwicklung eines MALT-Lymphoms, zu untersuchen (Müller et al., 2003). *Helicobacter-felis* entwickelt somit, ähnlich wie *H. pylori* im Menschen, eine chronisch aktive Gastritis sowie gastrale MALT-Lymphome. Die Infektion verschiedener Mausstämme mit ein und derselben Spezies resultiert in unterschiedlichen Immunantworten und *Helicobacter*-induzierten Krankheitsbildern. So entwickeln *H. felis* infizierte SJL, C3H/He, DBA/2 und C57BL/6 Mäuse eine starke Entzündungsreaktion, wohingegen in infizierten BALB/c und CBA Mäusen nur eine milde Inflammationsantwort beobachtet werden kann (Mohammadi et al., 1996; Nedrud, 1999; Sakagami et al., 1996). Enno und Kollegen zeigten, dass *H. felis*-infizierte BALB/c Mäuse nach Langzeitinfektion, ähnlich den gastralen B-Zell-Lymphomen des Menschen, MALT-Lymphome entwickeln (Enno et al., 1995), die sich ebenso durch eine Eradikationstherapie behandeln lassen und

zur Regression des Lymphoms führen (Enno et al., 1998). BALB/c Mäuse zeigen im Gegensatz zu C57BL/6 Mäusen geringe gastrale epitheliale Schäden, bilden aber im Gegenzug nach einem Follow-up von 22 Monaten zu 36 % lymphoides Gewebe aus und sind somit prädisponiert für die Entwicklung von MALT-Lymphomen (Enno et al., 1995). Die Tatsache, dass sich C57BL/6 Mäuse durch eine Th1-Immunantwort ausweisen, wohingegen BALB/c Mäuse vordergründig zu den Th2-dominanten Mausstämmen gehören, erklärt die unterschiedlichen Krankheitsbilder, die allein durch ein und denselben Keim ausgelöst werden können (Ferrero et al., 2000).

Der Grad der Inflamationsreaktion ist allerdings, neben den verschiedenen Mausstämmen bzw. Wirtsfaktoren, von der jeweiligen *Helicobacter*-Spezies abhängig (De Bock et al., 2005). Die Arbeitsgruppe um Prof. Müller in Zürich konnte zeigen, dass nicht nur die Infektion mit *H. felis*, sondern auch eine Infektion mit *H. heilmanii* zu gastralen MALT-Lymphomen in BALB/c Mäusen führt (Müller et al., 2003). *H. felis* gehört interessanterweise zu derjenigen *Helicobacter*-Spezies, die sich durch ein Fehlen verschiedener Pathogenitätsfaktoren auszeichnet. Sowohl die *cag*-Pathogenitätsinsel, als auch das vakuolisierende Zytotoxin A und die Adhäsine Bab und Sab fehlen dem Keim. Im Gegensatz zu *H. pylori*, der an den Magenepithelzellen adhärieren kann, befindet sich *H. felis* somit frei im Mukus der Magendrüsen (Smet et al., 2011).

Aufgrund der Tatsache, dass dem Bakterium mehrere wichtige Pathogenitätsfaktoren fehlen, spielt das *H. felis*-infizierte Mausmodell eine essentielle Rolle bei der Untersuchung verschiedener Wirtsfaktoren gastraler Erkrankungen.

1.6.2 *Plcg2^{Ali5}* Mäuse

Ein besonderes Mausmodell stellt die Mauslinie *Ali5* (**A**bnormal **l**imb **5**) dar, die mit Hilfe einer ENU (N-ethyl-N-nitrosourea)-behandelten C3HeB/FeJ (C3H) Maus etabliert wurde (Yu et al., 2005). *Ali5*-Mäuse weisen genotypisch eine *gain-of-function*-Punktmutation auf Chromosom 8 in Exon 27 des *Plcg2*-Gens auf und zeigen Symptome einer entzündlichen Autoimmunerkrankung, die sich je nach genetischem Hintergrund des Mausstammes in spontanen Schwellungen und Entzündungen der Pfoten äußert sowie einem humanen systemischen Lupus Erythematoses (SLE) ähnelt. So zeigen heterozygote C3H *Plcg2^{Ali5/+}* Mäuse eine Arthritis der Pfoten, während bei heterozygoten B6C3 *Plcg2^{Ali5/+}* Mäusen (Rückkreuzung C57BL/6 x C3HeB/FeJ) weder makroskopisch noch histologisch eine

chronische Entzündung zu sehen ist. B6C3 *Plcg2^{Ali5/+}* Mäuse entwickeln wiederum Autoantikörper und eine Glomerulonephritis (Entzündung der Nierenkörperchen), wohingegen homozygote B6C3 *Plcg2^{Ali5/Ali5}* Mäuse zusätzlich eine Keratitis (Hornhautentzündung der Augen), eine Wachstumsverminderung sowie ebenfalls eine chronische Inflammation der Pfoten zeigen (Yu et al., 2005).

Ursache für diese dramatischen phänotypischen Merkmale ist ein Einzelnukleotidpolymorphismus, also ein einzelner Austausch der Aminosäuren Asparagin zu Glycin an Position 993 (D993G), innerhalb der katalytischen Domäne bzw. der hydrophoben Bindungsstelle (HRL3) im *Plcg2*-Gen. Wie bereits in Kapitel 1.5.1 beschrieben, wirkt diese Region unter normalen Umständen an der Membraninteraktion von Plcγ2 mit und verhindert eine langanhaltende Enzymaktivität. Die negative Ladung der katalytischen Domäne bzw. der *X/Y-linker* Region sowie die negativ-geladene Plasmamembran hindern Plcγ2 an einer langanhaltenden Membraninteraktion (Ellis et al., 1998). Der einzelne Aminosäureaustausch im *Plcg2^{Ali5}*-Gen führt dazu, dass die ursprünglich vorhandene negative Ladung der katalytischen Domäne aufgehoben wird. Die Konsequenz ist dabei eine erhöhte Membranstabilität von Plcγ2^{Ali5}. Als Antwort einer BCR-Aktivierung kommt es zu einer gesteigerten Plcγ2-Aktivität und somit zu einem Anstieg an IP₃ und folglich zu einem langanhaltenden Ca²⁺ Fluss in B-Zellen und einer gesteigerten B-Zell-Proliferation (Yu et al., 2005). Ein weiteres Charakteristikum von *Ali5*-Mäusen ist die erhöhte Ratio von T-Zellen versus mature (reifen) B2-Zellen, die sich ebenfalls durch die Plcγ2 Hyperaktivität in stimulierten Zellen erklären lässt. Eine erhöhte Deletion von reifen B2-Zellen, aufgrund eines reduzierten Schwellenwerts während der Negativ-Selektion, ist die Folge. Bedingt durch den Anstieg von CD21^{hi}CD23^{lo} MZ B-Zellen (auf Kosten von CD21^{int}CD23^{hi} folliculären B-Zellen), weisen *Ali5*-Mäuse eine verminderte B-Zellzahl auf. Die erhöhte Anzahl MZ B-Zellen lässt sich damit erklären, dass B1- und MZ B-Zellen weniger sensitiv auf eine Negativ-Selektion reagieren, und es somit während der Positiv-Selektion zu einer starken Proliferation dieser Zellen kommt (Yu et al., 2005).

1.7 Hypothese und Zielsetzung

Gastrale MALT-Lymphome des Menschen entstehen auf der Basis einer *H. pylori*-vermittelten jahrelangen chronischen Entzündungsreaktion. Obwohl mehr als die Hälfte der

Weltbevölkerung mit *H. pylori* infiziert ist, entwickelt nur ein sehr kleiner Teil der Menschen im Verlauf von Jahrzehnten ein gastrales MALT-Lymphom. Eine Eradikationstherapie des Keims kann in den meisten Fällen gastraler MALT-Lymphome im frühen Stadium eine langanhaltende Remission bewirken.

Zum Verständnis der Entstehung von gastralen MALT-Lymphomen ist es wichtig, Erkenntnisse über potentielle Zielgene bzw. bestimmte Wirtsgen-Polymorphismen zu erlangen, die das *Helicobacter*-induzierte Lymphomüberleben beeinflussen.

Eine Überexpression des *PLCG2*-Gens, welches für ein wichtiges proinflammatorisches Protein kodiert, konnte im gastralen MALT-Lymphom des Menschen nachgewiesen werden. In dieser Arbeit sollte anhand der *Ali5*-Maus, welche durch eine *gain-of-function*-Mutation im *Plcg2*-Gen eine gesteigerte Entzündungsreaktion sowie eine B-Zell-vermittelte Autoimmunität aufweist, die Rolle dieses Proteins bei der Genese des MALT-Lymphoms untersucht werden.

Folgende Hypothese wurde aufgestellt:

Eine *gain-of-function*-Mutation im *Plcg2*-Gen führt unter einer *Helicobacter*-Infektion zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion und konsekutiv zu einer früheren und höheren Inzidenz von MALT-Lymphomen.

Um die Hypothese zu bestätigen, sollte im Rahmen dieser Arbeit, mit Hilfe des *Ali5*-Mausmodells, die Rolle von *Plcg2* in der Pathogenese von Magenlymphomen auf der Basis einer chronischen *H. felis*-induzierten Entzündung untersucht und im Detail folgende Fragen beantwortet werden:

- (1) Welchen Einfluss hat die *Plcg2 gain-of-function*-Mutation auf die MALT-Lymphom Entstehung?
- (2) Beeinflusst die *Plcg2 gain-of-function*-Mutation die Induktion proinflammatorischer Gene?
- (3) Welchen Einfluss hat die *Plcg2 gain-of-function*-Mutation auf die totale und *H. felis*-spezifische Antikörperantwort?
- (4) Welche Rolle spielen B- und T-Zellen bei der Entstehung des MALT-Lymphoms in diesem Modell?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

α -Cyclodextrin	AppliChem, Darmstadt, D
Aceton	Acros Organics, Geel, BE
Agarose UltraPure™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Amphotericin B	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
β -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Bacto-Agar	Gibco-BRL, Karlsruhe, D
BM Blue POD Substrat (soluble TMB)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D
Brain-Heart Infusion (BHI)	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, D
Columbia Agar Base	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, D
Dako Wasch-Puffer (10 x)	Dako GmbH, Hamburg, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA, Darmstadt, D
dNTP Set, 100 mM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Entellan® (Schnelleindeckmittel)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Eosin G-Lösung (0,5 % wässrig)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Promega GmbH, Mannheim, D
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco-BRL, Karlsruhe, D
Ficoll-Paque™ PLUS	Amersham Biosciences, NJ, USA
Formaldehyd-Lösung (3,5-3,7 %)	Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, D
Glycerol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Hämalaunlösung (Mayers Lösung)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Karbol-Gentianaviolett-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, D

Lugolsche Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, D
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Orange DNA Loading Dye (6 x)	Fermentas, St. Leon Rot, D
Penicillin/Streptomycin (15140-114)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Pepton	Gibco-BRL, Karlsruhe, D
Pferdeblut, defibriniert	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, D
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄ , 95-97 %)	Merck KGaA, Darmstadt, D
SOC-Medium	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
Steriles Wasser (Aqua dest)	B. Braun, Melsungen, D
Target Retrieval Solution	Dako GmbH, Hamburg, D
3-(Triethoxysilyl)-propylamin (TESAP)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Trimethoprim	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Trypanblau (0,4%ig)	Sigma-Aldrich, München, D
Tween®20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Xylol	Honeywell Riedel-de-Haën®, Seelze, D
Yeast Extract	Gibco-BRL, Karlsruhe, D
Ziehl-Neelsen Karbolfuchsin-Lösung	Merck KGaA, Darmstadt, D

2.1.2 Geräte

Anaerobentopf (Anaerocult®)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Analysenwaage	OHAUS, NJ, USA
Autoklav (Typ 5075 ELV)	Systec GmbH, Wettenberg, D
Brutschrank	Heraeus Christ, Osterode, D
Durchlicht-Mikroskop (DMRB)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D

ELISA Reader (Sunrise™ Absorbance Reader)	TECAN GmbH, Crailsheim, D
Feinwaage AE50	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, D
Glaswaren	Schott Duran GmbH, Mainz, D
horizontale Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D
Immuno™ 12 Mikrotiterplatten-Washer	TECAN GmbH, Crailsheim, D
Inkubationsschüttler Innova® 4000	NBS, Edison, NJ, USA
LSRII Flow Cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, D
Mastercycler® ep realplex 2 S	Eppendorf AG, Hamburg, D
Mikroliterpipetten	Gilson, Middleton, WI, USA
Mikrotom (Rotationsmikrotom HM325)	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Mikrotom (Schlittenmikrotom 2000R)	Leica Microsystems GmbH, Nussloch, D
Mikrozentrifuge 5417C und 5417R	Eppendorf AG, Hamburg, D
NanoDrop™ 1000	PeqLab Biotechnology, Erlangen, D
Olympus Mikroskop (BH-2)	Olympus GmbH, Hamburg, D
Photometer (BioPhotometer)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Pipettierhilfe (accu-jet® pro)	BrandTech® Scientific, CT, USA
Schlundsonde (gebogen)	Kent Scientific Corporation, CT, USA
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
Thermocycler gradient	Eppendorf AG, Hamburg, D
Thermomixer (Heizblock)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Tischkühlzentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Ultrazentrifuge J2-21	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, D
UV-Transilluminator	PeqLab Biotechnology, Erlangen, D
Vortex Schüttler	IKA-Labortechnik, Staufen, D
Wasserbad	Unitherm, Würzburg, D

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Deckelstrips	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
ELISA 96-Well Mikrotiterplatten	Nunc™, Roskilde, DK
FACS-Röhrchen	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, D

Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
GasPak™ EZ Campy Behältersystem	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Injektionsspritzen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D; B. Braun AG, Melsungen, D
MACS Separation Columns (LS)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
PCR Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Biozym GmbH, Hess.-Oldendorf, D
Pipettenspitzen (gestopft)	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, D
Plattierungsspatel	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, D
Polypropylen PCR-Platten (96 Well)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Pre-Separation Filter (70 µm)	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
Reaktionsgefäße (1,5 ml-2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg, D
Serologische Pipetten	Sarstedt AG & CO., Nümbrecht, D
Sterilfilter (Millex GP; 0,2-0,45 µm)	Millipore GmbH, Schwalbach, D
Zellkulturplatten (6/12/24/48/96 Well)	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen, D

2.1.4 Puffer und Lösungen

- **Antibody Diluent (IHC)**, gebrauchsfertig (Dako GmbH, Hamburg)
- **Beschichtungspuffer (pH 8.3) (ELISA)**: 4,2 g NaHCO₃, ad 500 ml dH₂O
- **Blocking-Puffer (ELISA)**: 1 % BSA in PBS
- **DNA-Lyse Puffer (Genotypisierung)**: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % SDS
- **Erythrozyten-Lysepuffer (pH 7.5)**: 155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA
- **MACS-Puffer**: 0,2 M EDTA, 0,5 % BSA in PBS
- **Peroxidase-Blocking Solution (IHC)**, gebrauchsfertig (Dako GmbH, Hamburg)
- **Staining-Puffer (FACS)**: 2 % FCS in PBS
- **Stopplösung (ELISA)**: 2 M H₂SO₄
- **TAE-Puffer 1 x (pH 8.0) (Gelelektrophorese)**: 40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA
- **Target Retrieval Solution (IHC)**, gebrauchsfertig (Dako GmbH, Hamburg): Citrate (pH 6.0) oder Tris/EDTA (pH 9.0)
- **TES-Puffer**: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl
- **Waschpuffer (ELISA)**: 0,1 % Tween 20, ad 1 L 1 x PBS

- **Wash Buffer 10 x (IHC):** gebrauchsfertig (Dako GmbH, Hamburg)

2.1.5 Kit-Systeme

BBL™ DrySlide™ Oxidase	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
BrdU Flow Kit	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Custom RT ² Profiler PCR Array	Qiagen GmbH, Hilden, D
Dako Real™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse & Dako REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+, Rabbit	Dako GmbH, Hamburg, D
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
GeneAmp® PCR Reagent Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Helicobacter-Urease-Test	Astra Zeneca GmbH, Wedel, D
NucleoBond® PC Kit (Plasmid Mini/Maxi Kit)	Macherey-Nagel GmbH, Düren, D
NucleoSpin FFPE DNA Kit	Macherey-Nagel GmbH, Düren, D
Omniscript® Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Regulatory T Cell Staining Kit #2 (mouse)	Affymetrix - eBioscience, Inc. CA, USA
RNeasy Protect Animal Blood Kit & Tubes	Qiagen GmbH, Hilden, D
RT ² SYBR Green ROX qPCR Mastermix	Qiagen GmbH, Hilden, D
RT ² First Strand Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
TOPO® TA Cloning® Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D
VECTASTAIN® Elite ABC Kit	Vector Laboratories, Inc., CA, USA

2.1.6 Bakterienstämme und Vektoren

2.1.6.1 Bakterienstämme

- *E. coli* One Shot TOP10 Chemically Competent Cells (Invitrogen GmbH, Karlsruhe)
- *Helicobacter felis* CS1, ATCC-Nummer: 49179 (Paster et al., 1991) (American Type Culture Collection, ATCC, Manassas, VA, USA)

2.1.6.2 Vektoren

- pCR 2.1 TA Cloning Vektor 3,9 kb (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D): LacZ α -Gen, Ampicillin- und Kanamycinresistenz, T7-, M13 priming site

2.1.7 Medien für primäre Zellen und Bakterien

2.1.7.1 Medien der Zellkultur

- **Maus-B-Zell Medium:** RPMI 1640 (500 ml), 10 % FCS (fetales Kälberserum), 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0,1 % β -Mercaptoethanol

2.1.7.2 Nährmedien und Agarplatten

- **LB-Medium:** 10 g Pepton, 5 g Yeast Extract, 10 g NaCl, ad 1 L H₂O
- **LB-Platten:** +15 g Bacto-Agar (autoklaviert); + 100 μ g/ml Ampicillin
- ***H. felis*-Platten:** 4 % Columbia Agar Base (autoklaviert), 5 % defibriniertes Pferdeblut, 0,2 % α -Cyclodextrin, 5 μ g/ml Trimethoprim, 8 μ g/ml Amphotericin B

2.1.7.3 Einfriermedien

- ***Helicobacter felis*:** 75 % BHI, 15 % Glycerin, 10 % FCS

2.1.8 Oligonukleotide

Die verwendeten Primer wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden mit dH₂O auf eine Ausgangskonzentration von 100 μ M eingestellt; die Arbeitskonzentration betrug 10 μ M. Die Sequenzen wurden aus der Literatur entnommen oder mit Hilfe des „Primer designing tools“ auf folgender Internetseite erstellt: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.

Tabelle 3: Verwendete Oligonukleotide für die RT- und quantitative PCR.

Oligoname	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Produktlänge (Bp)	Spezies
Amplifikations-Primer				
CAR557.for	TGCGTAGGCGGGGTTGTAAG	58	78	<i>H. felis</i> Ref (De Groote et al., 2001)
CAR636.rev	CAGAGTTGTAGTTTGAATGC			
m.TNFRSF13C.for	CCGCACTCCTGGGACTGATACTG	64	84	Maus
m.TNFRSF13C.rev	TCCTGAGCTGTTGACGCCACC			
m.GAPDH.for	CATGGCCTTCCGTGTTCTTA	58	104	Maus
m.GAPDH.rev	CCTGCTTCACCACCTTCTTGA			
m.IFN γ .for	GAGCCAGATTATCTTTCTACCTC	60	92	Maus
m.IFN γ .rev	GGTGTGATTCAATGACGCTTATG			
m.IL-1a.for	TTAAATCCTCTGAGCTTGACGGCAC	63	124	Maus
m.IL-1a.rev	GGAGAGCTTCGTGGCTGTGGA			
m.S100A8.for	GGAGTTCCTTGCGATGGTGATAAAAG	63	63	Maus
m.S100A8.rev	TACTCCTGTGGCTGTCTTTGTGAG			

Tabelle 4: Verwendete Genotypisierungs-Oligonukleotide.

Oligoname	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Produktlänge (Bp)	Spezies
Genotypisierungs-Primer				
m.PLCg2-SL1.for	GCATCCTCAGGTAGCAGGAG	57	Freundlicherweise von Dr. Yu (Institut für Immunologie, BMFZ, Marburg) zu Verfügung gestellt	Maus
m.PLCg2-SR2.rev	CACTAGCTGCCAAGTGACA			

Tabelle 5: Verwendete Sequenzier-Oligonukleotide.

Oligoname	Sequenz (5'→3')	Tm [°C]	Produktlänge (Bp)	Spezies
Sequenzier-Primer				
M13.rev	CAGGAAACAGCTATGACC	50	-	Plasmid
T7-Promotor	TAATACGACTCACTATAGGG	50	-	Plasmid

Das verwendete Oligodesoxynukleotid (ODN) CpG-ODN 1826 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3' (TIB MOLBIOL Syntheselabor GmbH, Berlin, D) gehört zu den Typ B spezifischen murinen TLR9 Liganden und wurde für die Maus-B-Zell-Stimulation verwendet.

2.1.9 Antikörper und Proteine

Alle in Tabelle 6 aufgelisteten Antikörper und rekombinanten Proteine waren Maus-spezifisch.

Tabelle 6: Antikörper und rekombinante Proteine.

Name	Isotyp	Verdünnung/ Konzentration	Anwendung	Firma
Biotin anti-mouse IgG	Rabbit IgG	1:100	IHC	Vector Laboratories, Inc., CA, USA
Biotin anti-mouse IgG	Rat IgG	1:100	IHC	Vector Laboratories, Inc., CA, USA
Biotin anti-mouse IgG1	Rat IgG1, κ	1:200	ELISA	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Biotin anti-mouse IgG2a	Rat IgG1, κ	1:200	ELISA	BD Pharmingen, Heidelberg, D
CD3	Rabbit IgG	1:500	IHC	Thermo Fisher Scientific, MA, USA
CD4 - FITC	Rat IgG2a, κ	0,15 $\mu\text{g}/\text{Test}$	FACS	Affymetrix - eBioscience, Inc., CA, USA
CD25 - PE	Rat IgG1, λ	0,2 $\mu\text{g}/\text{Test}$	FACS	Affymetrix - eBioscience, Inc., CA, USA
CD40	Hamster IgM, κ	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	B-Zell-Stimulation	BD Pharmingen, Heidelberg, D
CD43 (Ly-48) MicroBeads	-	10 $\mu\text{l}/10^7$ Zellen	B-Zell-Separation - negative Selektion	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
CD45R/B220	Rat IgG2a, κ	1:200	IHC	BD Pharmingen, Heidelberg, D
CD45R/B220 - PE	Rat IgG2a, κ	0,25 μg	FACS	Affymetrix - eBioscience, Inc., CA, USA
CD45R/B220 MicroBeads	-	10 $\mu\text{l}/10^7$ Zellen	B-Zell-Separation - positive Selektion	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D
CD73 - eFluor® 450	Rat IgG1	0,2 $\mu\text{g}/\text{Test}$	FACS	Affymetrix - eBioscience, Inc., CA, USA

Foxp3	Rat IgG2a, κ	1:100	IHC	Affymetrix - eBioscience, Inc., CA, USA
Foxp3 - APC	Rat IgG2a, κ	0,5 μ g/Test	FACS	Affymetrix - eBioscience, Inc., CA, USA
IgG1 - APC	Rat IgG1, κ	0,5 μ g	FACS	Affymetrix - eBioscience, Inc., CA, USA
IgM (μ chain specific)	F(ab') ₂ -Goat	10 μ g/ml	B-Zell- Stimulation	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., PA, USA
IL-4	E. coli	10 ng/ml und 500 U	B-Zell- Stimulation	R&D Systems, Wiesbaden, D
Lipopolysaccharid	E. coli O111:B4	10 μ g/ml 20 μ g/ml	B-Zell- Stimulation	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
PanCK	Rabbit- Cytokeratin	1:500	IHC	Dako GmbH, Hamburg, D
Purified mouse IgG ₁ , λ (Isotyp Standard)	IgG ₁ , λ	erster Standard 200 ng/ml	ELISA	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Purified mouse IgG _{2a} , κ (Isotyp Kontrolle)	IgG _{2a} , κ	erster Standard 300 ng/ml	ELISA	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Purified rat anti- mouse IgG1	Rat IgG1, κ	8 μ g/ml	ELISA	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Purified rat anti- mouse IgG2a	Rat IgG1, κ	8 μ g/ml	ELISA	BD Pharmingen, Heidelberg, D

2.1.10 Enzyme

Dako REAL™

Dako GmbH, Hamburg, D

Streptavidin-Peroxidase (HRP)

HincII

Fermentas, St. Leon Rot, D

Proteinase K

Qiagen GmbH, Hilden, D

Ready-Lyse™ Lysozyme Solution

Epicentre Biotechnologies, WI, USA

RNase-free DNase Set

Qiagen GmbH, Hilden, D

Streptavidin-Peroxidase

Sigma-Aldrich, München, D

T4 DNA-Ligase

Invitrogen GmbH, Karlsruhe, D

Taq Polymerase

Applied Biosystems, Darmstadt, D

(AmpliTaQ® DNA Polymerase)

2.1.11 Molekulargewichtsstandards

- O'Gene Ruler™ 50 Bp, 100 Bp und 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon Rot, D)

2.1.12 Computerprogramme und externe Serviceeinheiten

Bildarchivierungs & -verwaltungssystem (Leica Image Manager - IM50)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, D
Bildbearbeitungsprogramme:	
Adobe® Photoshop® CS 8.0.1	Adobe Systems Inc., CA, USA
ImageJ v1.47	National Institutes of Health, MD, USA http://imagej.nih.gov/ij/
BLAST	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
DNA-Sequenzierung	SeqLab - Sequence Laboratories Göttingen GmbH, D
ELISA Auswertungssoftware Magellan 3.0	TECAN GmbH, Crailsheim, D
EndNote X5	Thomson Reuters, Carlsbad, D
FlowJo Software Version 7.6	Tree Star, Inc., OR, USA
GraphPad Prism®-Software Version 5.01	GraphPad Software Inc., CA, USA
Microsoft Office 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, D
ND-1000 V3.7.1	PeqLab Biotechnology, Erlangen, D
RT² Profiler Array Datenanalyse (webbasiert, v3.5 Software)	http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung und Charakterisierung von *Helicobacter felis*

Alle bakteriologischen Arbeiten wurden im Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene (BMFZ, Marburg) durchgeführt.

2.2.1.1 Anzucht, Vermehrung und Kryokonservierung

Helicobacter felis wurde in sterilem Einfriermedium (BHI mit 10 % FCS und 15 % Glycerin) bei -80 °C eingefroren. Für die Anzucht wurde ein Kryoröhrchen aufgetaut und der Inhalt auf 2-3 Blutagarplatten (siehe Kapitel 2.1.7.2) mit einem Einmal-Plattierungsspatel verteilt. Die Kultivierung der Bakterien findet unter anaeroben, mikroaerophilen Bedingungen unter Verwendung der GasPak EZ Campy Behältersysteme (Becton Dickinson GmbH) in einem Inkubationsbehälter bei 37 °C statt. Die Bebrütung erfolgte in der Regel 5-6 Tage, wobei alle zwei Tage das GasPak EZ Campy Gasentwicklungssäckchen erneuert wurde.

Für die Vermehrung der Bakterien wurde das komplette Koloniematerial einer dicht bewachsenen Blutagarplatte mit einem Tupfer unter sterilen Bedingungen geerntet und in 1 ml BHI mit 10 % FCS resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde auf 3-5 neue Blutagarplatten pipettiert, mit einem Plattierungsspatel verteilt und unter den oben genannten Bedingungen kultiviert. Ebenso wurde für die Kryokonservierung das gesamte Koloniematerial einer Blutagarplatte in Einfriermedium geerntet, in Kryoröhrchen verteilt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.1.2 Charakterisierung

Vor dem Ernten von *Helicobacter felis* wurden die Kulturen auf Reinheit und Pathogenität mit Hilfe von phänotypischen und biochemischen Tests überprüft.

Von jeder Kultur wurde ein Gram-Präparat hergestellt und mikroskopisch auf gramnegative spiralförmige Bakterien analysiert. Ebenso wurden die Kulturen auf das Vorhandensein der *Helicobacter spp.*-spezifischen Enzyme (Katalase-, Oxidase- und Urease-Test) überprüft. Erst nach Charakterisierung von *H. felis* durften die Bakterien vermehrt, eingefroren oder für die Tierversuche eingesetzt werden.

Katalase-Test

Für den Katalase-Test wurde *H. felis* Koloniematerial mit einem sterilen Tupfer geerntet und auf einen Objektträger gegeben. Mit 3%iger Wasserstoffperoxidlösung wurde der Ausstrich überschichtet. Eine Blasenentwicklung bzw. Gasentwicklung entsteht durch Spaltung des Wasserstoffperoxids in Sauerstoff, aufgrund der im Bakterium enthaltenen Katalasen.

Oxidase-Test

Für den Oxidase-Test wurde das kommerziell erhältliche Testsystem BBL™ DrySlide™ Oxidase (Becton Dickinson GmbH) verwendet. Dabei wurde etwas *H. felis* Koloniematerial unter sterilen Bedingungen mit einem Tupfer geerntet und auf die Reaktionsfläche, bestehend aus Filterpapier mit N,N,N',N'-Tetramethyl-*p*-Phenylendiamin-Dihydrochlorid (TMPD, Reduktionssubstrat), verteilt. In Anwesenheit molekularen Sauerstoffs sind *Helicobacter spp.* in der Lage die Oxidation von Cytochrom C zu katalysieren. Das oxidierte Cytochrom C wird durch TMPD reduziert und ein violetter Farbumschlag ist die Folge.

Urease-Test

Der kommerzielle *Helicobacter*-Urease-Test (HUT-Test, Astra Zeneca GmbH) basiert auf dem Prinzip der Hydrolyse von Harnstoff zu Kohlenstoffdioxid und Ammoniak, welches durch das in *Helicobacter spp.* enthaltene Enzym Urease katalysiert wird. Für den Urease-Schnelltest wurde etwas Koloniematerial mit einem sterilen Tupfer geerntet und in einem kleinen Volumen PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde anschließend in die Reaktionsfläche des Tests pipettiert. Ein Farbumschlag von gelb nach rosa weist auf eine positive Urease-Aktivität der Bakterien hin.

Gram-Färbung

Die Gram-Färbung ist eine Methode für die Differenzierung in grampositive und gramnegative Bakterien.

Für die Färbung wurde Koloniematerial in einem Tropfen physiologischer NaCl-Lösung auf einem Objektträger resuspendiert. Nach Lufttrocknen wurde dieses kurz über einem Bunsenbrenner hitzefixiert und gefärbt. Das Präparat wurde für drei Minuten mit Karbol-Gentianaviolett-Lösung und zwei Minuten mit Lugolscher Lösung überschichtet, wodurch alle Bakterien dunkelblau erschienen. Im nächsten Schritt folgte das Differenzieren der Bakterien mit 96 % Ethanol, wobei der Farbstoff in grampositiven Bakterien nicht herausgewaschen werden konnte. Anschließend wurde das Präparat mit H₂O gespült und 1-2 Minuten mit Ziehl-Neelsen Karbolfuchsin-Lösung (1:10 in H₂O) gegengefärbt. Nach einem weiteren Abspülen des bakteriologischen Präparats mit H₂O und anschließendem Lufttrocknen, konnten die Bakterien unter dem Lichtmikroskop bei 1000-facher Vergrößerung differenziert werden. Grampositive Bakterien besitzen eine dunkelviolette

bis dunkelblaue Färbung, wohingegen gramnegative Bakterien, wie *Helicobacter spp.*, rot erscheinen.

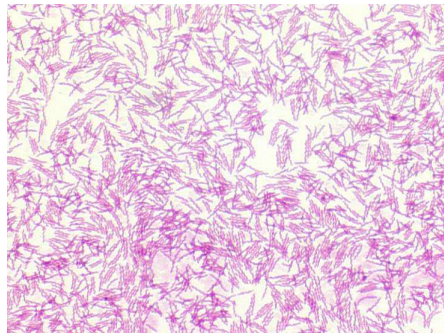


Abbildung 6: Gram-Färbung von *Helicobacter felis*.

2.2.1.3 Messung der Bakteriendichte

Vor dem Ernten der Bakterien wurden die phänotypischen und biochemischen Methoden zur *H. felis* Beurteilung bzw. Charakterisierung durchgeführt. Erst nach positivem Ergebnis wurde das gesamte Koloniematerial der Blutagarplatten mit einem Tupfer unter sterilen Bedingungen in PBS geerntet und auf Eis gestellt. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) der Bakteriensuspension bei 600 nm im Photometer gemessen.

2.2.2 Versuchstiere

Die Durchführung der Tierversuche erfolgte nach Genehmigung des Regierungspräsidiums Gießen (Veterinärdezernat) (Aktenzeichen V54-19 c 20-15(1) MR 20/11 - Nr. 21/2009 und V54-19 c 20 15 h 01 MR 20/36 - Nr. 77/2012) und fand in der tierexperimentellen Einrichtung des Biomedizinischen Forschungszentrums Marburg im Infektionsbereich statt.

2.2.2.1 Haltung, Zucht und Genotypisierung der Mäuse

Die Wildtyp BALB/c Mäuse (BALB/c, B:Bragg, alb: albino) stammen von der Firma Harlan Winkelmann GmbH, 33176 Borcheln. *Ali5*-Mäuse mit *gain-of-function*-Mutation im *Plcg2*-Gen wurden von Herrn Dr. Yu (Institut für Immunologie, BMFZ, Marburg) zur Verfügung gestellt und auf den BALB/c Hintergrund zurückgekreuzt (mindestens in siebter Generation).

Es wurden ausschließlich heterozygote BALB/c *Ali5* (*Plcg2*^{*Ali5/+*}) und BALB/c WT Mäuse für die Infektionsversuche herangezogen (siehe Kapitel 2.2.2.3). Homozygote *Ali5*-Mäuse (*Plcg2*^{*Ali5/Ali5*}) wurden aufgrund ihres schwachen Gesundheitszustandes, ihren starken Entzündungsreaktionen und kurzer Lebensdauer nicht verwendet.

Alle Mäuse wurden unter standardisierten und spezifiziert pathogenfreien (SPF)-Bedingungen in einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus in der tierexperimentellen Einrichtung des Biomedizinischen Forschungszentrums (BMFZ) der Philipps-Universität Marburg gehalten und erhielten Futter und Wasser *ad libitum*.

Im Alter von drei Wochen wurden die Mäuse von den Elterntieren getrennt, die Geschwister nach Geschlecht umgesetzt und mittels Ohrlochung gekennzeichnet. Danach wurde für die Genotypisierung eine Schwanzbiopsie durchgeführt.

Für die Genotypisierung der Mäuse wurden 2-4 mm Gewebe der Schwanzspitze mit 500 µl DNA-Lyse Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 25 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % SDS) und 5 µl Proteinase K (10 mg/ml) in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß im Thermomixer (Eppendorf AG) bei 56 °C und 700 rpm über Nacht verdaut. Ein Einfrieren bei -20 °C war nach der Lyse möglich. Die Isolierung der DNA sowie die anschließende Genotypisierungs-PCR werden in Kapitel 2.2.5.1.1 (Seite 51) und Kapitel 2.2.5.5.1 (Seite 54) beschrieben.

2.2.2.2 Infektion der Mäuse

Nach positiver Charakterisierung von *H. felis* (siehe Kapitel 2.2.1.2) wurden die Mäuse infiziert. Dafür musste nach Ernten der Bakterien in PBS die Bakteriendichte ermittelt und auf einen OD von 1 eingestellt werden. Dies entspricht 1×10^9 Bakterien pro ml.

Die Inokulation von *H. felis* mittels Schlundsonde wurde je nach Mausgruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt, betrug aber immer jeweils 200 µl bzw. 2×10^8 Bakterien pro Maus.

2.2.2.3 Versuchsablauf

Eine Woche vor Versuchsbeginn wurden die BALB/c *Plcg2*^{*Ali5/+*} sowie WT Mäuse aus dem SPF-Bereich in den Infektionstierstall der tierexperimentellen Einrichtung des BMFZ Marburg transportiert und waren zu dem Zeitpunkt circa acht bis zehn Wochen alt.

Mausgruppe 1-3

Drei weibliche Mausgruppen mit BALB/c *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen wurden dreimal im Abstand von zwei Tagen mit *H. felis* infiziert (Tabelle 7).

Tabelle 7: *H. felis*-infizierte Mäuse der Gruppen 1-3.

Gruppe	Genotyp	Anzahl der Mäuse	Beobachtungszeitraum (Monate)	Entnahme von
1	<i>Plcg2</i> ^{Ali5/+}	11	6	Blut und Magen
	WT	11		
2	<i>Plcg2</i> ^{Ali5/+}	16	12	Blut und Magen
	WT	16		
3	<i>Plcg2</i> ^{Ali5/+}	17	16	Blut und Magen
	WT	17		

Nach 6, 12 und 16 Monaten wurde Blut aus der Schwanzvene für spätere Expressionsanalysen entnommen und die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet. Der Magen wurde entfernt und wie in Kapitel 2.2.2.6 & 2.2.3 beschrieben aufgearbeitet. Die Befundung der Mägen (Entwicklung eines gastralen MALT-Lymphoms), anhand der H&E-, B220- und Zytokeratin-Färbungen, erfolgte durch Herrn Prof. Dr. M. Stolte (Institut für Pathologie, Klinikum Kulmbach).

Mausgruppe 4

Mäuse der Gruppe 4 wurden zu Versuchsbeginn nur einmal mit *H. felis* infiziert. Eine Reinfektion fand jeden dritten Monat für insgesamt ein Jahr statt (Tabelle 8). Nach einer Beobachtungszeit von 12 Monaten wurden die Mäuse ebenfalls durch zervikale Dislokation getötet, der Magen histopathologisch aufgearbeitet und befundet.

Tabelle 8: *H. felis*-infizierte Mäuse der Gruppe 4.

Gruppe	Genotyp	Anzahl der Mäuse	Geschlecht m w		Beobachtungszeitraum (Monate)	Entnahme von
4	<i>Plcg2</i> ^{Ali5/+}	6	2	4	12	Magen
	WT	6	3	3		

Mausgruppe 5

Mäuse der Gruppe 5 wurden dreimal im Abstand von zwei Tagen mit *H. felis* infiziert. Die Beobachtungszeit betrug insgesamt drei Monate (Tabelle 9). Peripheres Blut aus der Schwanzvene wurde entnommen und Serum, wie in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben, gewonnen. Das Serum wurde für spätere Immunglobulin-ELISAs (siehe Kapitel 2.2.6.3 und Kapitel 2.2.6.4) bei -20 °C eingefroren. Nach zervikaler Dislokation wurden die Milzen entnommen, mononukleäre Zellen isoliert und für weitere Experimente (siehe Kapitel 2.2.4.2 bis 2.2.4.6) eingesetzt.

Tabelle 9: *H. felis*-infizierte Mäuse der Gruppe 5.

Gruppe	Genotyp	Anzahl der Mäuse	Geschlecht m w		Beobachtungs- zeitraum (Monate)	Entnahme von
5	<i>Plcg2</i> ^{Ali5/+}	15	8	7	3	Blut und Milz
	WT	15	8	7		

Eine engmaschige Überwachung der infizierten Mäuse in allen fünf Gruppen wurde während dieser Zeit durchgeführt. Mit Hilfe eines Scoring-Systems wurden zweimal wöchentlich, je nach äußerem Erscheinungsbild der Tiere (u. a. Piloerektion, Gewichtsverlust), Punkte verteilt. Dabei sollte ab einer Punktzahl von 7 eine frühzeitige Euthanasierung zur Vermeidung von weiterem Leiden der Tiere durchgeführt werden.

Uninfizierte *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäuse dienten als Kontrolle. Die histologische Befundung (MALT-Lymphom Entwicklung) der Mausmägen (n = 11 pro Genotyp) erfolgte ebenfalls durch Herrn Prof. Stolte. Für die Expressionsanalysen wurde Blut aus uninfizierten *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen entnommen (n = 4 pro Genotyp). Ein Teil der Milzen (n = 5 pro Genotyp) wurde in 3,5-3,7%iger Formaldehyd-Lösung fixiert, in Paraffin eingebettet (Kapitel 2.2.3.2.1) und für die immunhistologische CD3 und Foxp3 Färbung verwendet (Kapitel 2.2.3.4.1). Zugleich wurden Zellen aus Milz und mesenterialen Lymphknoten (mLN, engl.: *mesenteric lymph nodes*) isoliert und wie in Kapitel 2.2.4.5 und 2.2.4.6 beschrieben für Experimente eingesetzt.

2.2.2.4 Blutentnahme aus der Schwanzvene

Für die venöse Blutentnahme aus der Schwanzvene wurden die Mäuse zuerst 3-5 Minuten mit einer Rotlichtlampe bestrahlt, um die Durchblutung zu fördern. Nach Fixierung der Tiere, in einer extra dafür vorgesehenen Halterung für Mäuse, wurde mit einem sterilen Skalpell die Vene des Tieres angeschnitten. Je nach Experiment wurde das Blut auf unterschiedliche Weise gesammelt.

1. Für die RNA-Isolation aus peripherem Blut (Kapitel 2.2.5.2) wurde das dafür benötigte Volumen direkt in RNeasy Protect Animal Blood Tubes (Qiagen GmbH) aufgefangen, invertiert und anschließend bei -20 °C gelagert.
2. Für die Gewinnung von Serum wurde das Blut in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße gesammelt und für 4-5 Stunden bis zur vollständigen Gerinnung bei Raumtemperatur gelagert. Nach einer 10minütigen Zentrifugation bei 3000 x g wurde das Serum in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und bis zur Durchführung der Immunglobulin-ELISAs (Kapitel 2.2.6.4) bei -20 °C gelagert.

2.2.2.5 Maus-Magnetresonanztomographie

Eine bildgebende Diagnostik für die Beurteilung bzw. Entstehung von Lymphomen im Verlauf der Infektion mit *H. felis* bei Mäusen stellt eine Magnetresonanztomographie (MRT) dar. Die Untersuchungen fanden an einem 7 Teslar Kleintier Kernspintomographen (ClinScan 70/30 USR) der Firma Bruker, in Kooperation mit der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie (Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg), statt. Alle drei Monate wurde ein MRT mit Mäusen aus Gruppe 3, mit einem Follow-up von 16 Monaten, durchgeführt. Die Tiere wurden mittels 1-2%iger Isofluran-Inhalationsnarkose sediert und anschließend auf eine beheizbare Untersuchungsfläche, auf dem Bauch liegend, in den Magnetresonanztomograph gebracht. Für jedes Tier betrug die Untersuchungszeit circa 30-60 Minuten. Somit lag die Anästhesiezeit bei maximal 90 Minuten.

2.2.2.6 Sektion der Mäuse und Organentnahme

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet und vor Eröffnung des Bauchraumes mit 70 % EtOH desinfiziert.

Entnahme der Milzen und mesenterialen Lymphknoten

Direkt nach Sektion wurde jede Milz in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte jeder Milz wurde in 3,5-3,7%iger Formaldehyd-Lösung fixiert, die andere Hälfte in einer sterilen Petrischale (Ø 3,5 cm) bis zur weiteren Aufarbeitung (siehe Kapitel 2.2.4.2, Seite 48) auf Eis gelagert.

Die mesenterialen Lymphknoten wurden mit zwei sterilen Pinzetten entnommen, in ein mit PBS befülltes 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und ebenfalls auf Eis gelagert.

Entnahme und Präparation der Mägen

Der Magen wurde freigelegt und der Ösophagus von der Cardia (Mageneingang) mit einer Schere getrennt. Dann folgte die Trennung des Magens vom Duodenum (Dünndarm) direkt hinter dem Pylorus (Pförtner). Der freipräparierte Magen wurde anschließend mit einem Skalpell entlang der großen Krümmung in zwei gleiche Hälften geteilt und in NaCl gespült, um den Mageninhalt zu entfernen. Anschließend wurde eine Hälfte des Magens auf eine handelsübliche Korkplatte mit Stecknadeln aufgespannt und in ein mit 5 ml Formaldehyd-Lösung befülltes 50 ml Falcon-Röhrchen, bis zur weiteren histologischen Verarbeitung, überführt. Die andere Hälfte wurde bei -80°C gelagert.

2.2.2.7 Nachweis von *Helicobacter felis* in den infizierten Mäusen

Eine *H. felis* Besiedelung im Magen der infizierten Mäuse wurde mittels einer 16S ribosomal DNA (rDNA) basierten PCR Methode nachgewiesen. Mit Hilfe von 16S rDNA-Primern (CAR557.for und CAR636.rev, Primersequenzen siehe Seite 32) konnte diese hochkonservierte Region der Bakterien amplifiziert werden (De Groote et al., 2001) (siehe Kapitel 2.2.5.7.1).

2.2.3 Histopathologische Methoden

2.2.3.1 Beschichtung der Objektträger

Für eine bessere Haftung der Gewebeschnitte, insbesondere für die immunhistologischen Färbungen, wurden die Objektträger mit TESAP (3-(Triethoxysilyl)-propylamin) beschichtet. Die Objektträgerbeschichtung fand im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps-Universität Marburg statt.

Für das Silanisieren der Objektträger wurden diese in eine dafür vorgesehene Halterung platziert und wie folgt gewaschen:

- Waschen der Objektträger für eine Stunde mit heißem Wasser und Spülmittel auf einem Schüttler,
- dreimaliges Waschen mit heißem Wasser,
- einmal Waschen mit demineralisiertem Wasser,
- einmal Waschen mit Reinstwasser (Aqua bidest.),
- Waschen der Objektträger für 45 Minuten mit 70%igem EtOH auf einem Schüttler,
- Trocknen der Objektträger über Nacht in einen 60 °C heißen Umluftofen.

Am zweiten Tag folgte die Beschichtung mit TESAP:

- Beschichten der Objektträger mit 2%iger TESAP-Lösung in Aceton (200 ml Aceton mit 4 ml TESAP) für 30 Sekunden,
- Eintauchen der Objektträger in 200 ml Aceton für 30 Sekunden,
- erneutes Eintauchen in 200 ml Aceton für 30 Sekunden,
- Waschen der Objektträger in demineralisiertem Wasser und Aqua bidest (jeweils kurz),
- Trocknen der Objektträger über Nacht bei 42 °C im Trockenschrank.

2.2.3.2 Anfertigung von Gewebeschnitten

2.2.3.2.1 Paraffineinbettung

Nach Fixation des Gewebes in 3,5-3,7%iger Formaldehyd-Lösung wurden die Mägen und Milzen, in Kooperation mit dem Institut für Pathologie (Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg), in Paraffin eingebettet (Einbettautomat Tissue Tek VIP, Sakura Finetek Germany GmbH).

Über eine aufsteigende Alkoholreihe wird das Gewebe entwässert und mit Hilfe von Xylol vom Alkohol befreit (je 2 x 5 Minuten in 70 %, 96 %, 100 % EtOH und 3 x 10 Minuten Xylol).

Die Magenhälften wurden senkrecht nach oben stehend in einer Einbettkassette mit 60 °C heißem Paraffin übergossen und auf einer kalten Platte ausgehärtet. Somit wurde ermöglicht, die komplette Magenregion, von Fundus bis Antrum, mit einem Schnitt zu erfassen.

2.2.3.2 Herstellung histologischer Schnitte

Die Anfertigung der Gewebeschnitte von Milz sowie für alle H&E-Färbungen fand im Institut für Pathologie (Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg) an einem Schlittenmikrotom statt.

Stufenschnitte der Mäusmägen wurden hingegen im Institut für Anatomie und Zellbiologie (Philipps-Universität Marburg) angefertigt. Mit dem dortigen Rotationsmikrotom (Microm HM325) konnten 3-4 µm dünne Stufenschnitte hergestellt werden, die mit permanentem Wasserstrom in ein 42 °C warmes Wasserbad (entgastes Aqua bidest) rutschten und sich dort streckten. Die Schnitte wurden auf die TESAP-beschichteten Objektträger aufgezogen und auf einer Wärmeplatte getrocknet. Um ein Ablösen der Schnitte vom Objektträger zu vermeiden, wurden die Schnitte für mehrere Stunden bei 60 °C inkubiert.

Vor der histologischen und immunhistologischen Färbung mussten die Schnitte 3 x 10 min in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (je 2 x 5 min in 100 %, 96%, 70 % EtOH) rehydriert und mit Aqua dest. gespült werden.

2.2.3.3 Histologische Färbemethoden

Alle aufgeführten histologischen und immunhistochemischen Färbemethoden wurden von dem Institut für Pathologie (Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg) durchgeführt.

Hämalaun-Eosin-Färbung

Die Hämalaun-Eosin-Färbung (H&E-Färbung) wurde in einem Linear-Färbeautomat (Tissue Stainer COT 20) der Firma Medite durchgeführt und als Übersichtsfärbung zur Einschätzung von Entzündungsprozessen im Mäusmägen, bzw. der Entwicklung von gastralen MALT-Lymphomen, eingesetzt. Dafür wurden die Präparate 4 x 2 Minuten mit Mayers Hämalaunlösung [1:5 in Aqua dest.] gefärbt. Nach einem 2 x 2-minütigen Bläuen der Schnitte in Aqua dest. folgte die Gegenfärbung in einer Eosin-G-Lösung [0,5 % wässrig] für 3 x 2 Minuten. Die Schnitte wurden anschließend in Aqua dest. gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (je 2 x 5 Minuten in 70 %, 96 %, 100 % EtOH) entwässert und 3 x 10 Minuten in Xylol geklärt. Als Schnelleindeckmedium wurde Entellan® verwendet.

2.2.3.4 Immunhistologische Färbemethoden

Zur Beurteilung einer gastralen MALT-Lymphom Entwicklung der Mäuse aus den Gruppen 1-4 wurden die Magenpräparate mit CD45R/B220 und PanCK gefärbt. Die dafür verwendete Antigen-Antikörper Reaktion, zur Herstellung von immunhistologischen Präparaten, beruhte dabei auf der LSAB-Methode (Labeled (Strept-)Avidin-Biotin-Methode). Vor der eigentlichen Färbung im Färbeautomaten (Autostainer Plus, Dako GmbH) mussten die Präparate demaskiert werden, denn formalinfixiertes und paraffineingebettetes Gewebe verliert seine Immunreaktivität. Antigene Bindungsstellen bzw. Epitope werden durch die Fixierung quervernetzt. Aufgrund dessen ist es für den Antikörper unmöglich, die Bindungsstellen zu erkennen. Für die Wiederherstellung der Epitope wird eine Antigendemaskierung bzw. ein Antigen-Retrieval durchgeführt. Die Demaskierung der Schnitte erfolgte, je nach gewünschter Färbung, mit unterschiedlicher Vorbehandlung unter Nutzung der Target Retrieval Solution (Dako GmbH) für 45 Minuten in einem Dampfkocher [CD45R/B220 - Target Retrieval Solution, Citrat (pH 6.0); PanCK - Target Retrieval Solution, Tris/EDTA (pH 9.0)]. Anschließend wurden die Schnitte kurz mit Aqua dest. gespült. Es folgte eine endogene Enzymblockierung der Gewebeschnitte mit der gebrauchsfertigen Peroxidase-Blocking-Solution (Dako GmbH) mit anschließendem Waschschrift (Wash Buffer, Dako). Die Primärantikörper wurden mit dem Antibody Diluent (Dako GmbH) verdünnt und die Schnitte 45 Minuten inkubiert [anti-CD45R/B220 1:200; anti-PanCK 1:500]. Nach Verwendung des Primärantikörpers, folgte eine 20-minütige Inkubation mit den biotinylierten Zweitantikörpern [anti-rabbit IgG 1:100; anti-rat IgG 1:100]. Anschließend wurde die Streptavidin Peroxidase basierte Detektion mit dem Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/DAB+ Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Präparate wurden 5 Minuten mit dem Tertiärreagenz, der Streptavidin Peroxidase, inkubiert und die Reaktion direkt im Anschluss mit dem Chromogen Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht, welches eine braune Farbreaktion hervorruft. Nach jedem Schritt folgte ein Waschen der Schnitte mit dem gebrauchsfertigen Waschpuffer von Dako.

Im Anschluss wurden alle immunhistologisch gefärbten Schnitte mit Mayers Häkalaunlösung (1:5 in Aqua dest.) für 1 Minute gegengefärbt. Die Präparate wurden mit Leitungswasser gebläut, mit einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, 3 x 10 Minuten mit Xylol geklärt und letzten Endes mit Entellan® eingedeckt.

Bei jeder Färbereihe wurden zusätzlich Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

2.2.3.4.1 Immunhistologie von CD3 und Foxp3 im Milzgewebe

Für die CD3 und Foxp3 immunhistologischen Färbungen wurden Serienschnitte von FFPE-Milzpräparaten uninfizierter Mäuse verwendet. Die Demaskierung der Epitope erfolgte mit Hilfe der Target Retrieval Solution [CD3 - Tris/EDTA (pH 9.0), Foxp3 - Citrat (pH 6.0)]. Nach Inkubation der Primärantikörper [anti-CD3 1:500; anti-Foxp3 1:100] wurden schließlich zwei unterschiedliche immunhistologische Färbemethoden angewendet. Das Dako REAL™ EnVision™ Detection System wurde für die CD3 Färbungen verwendet und basiert auf zwei aufeinanderfolgenden Schritten. Der erste Schritt besteht aus der Inkubation des Primärantikörpers; der zweite Schritt in einer 20-minütigen Inkubation mit dem gebrauchsfertigen Dako REAL™ EnVision™, einem peroxidasekonjugiertem Polymer.

Für die Foxp3 Färbung wurde nach einer 30-minütigen Inkubation mit dem biotinyliertem Zweitantikörper [anti-rat IgG 1:100] die ABC-Methode (Strept-)Avidin-Biotin-Complex-Methode) mit Hilfe des VECTASTAIN® Elite ABC Kits der Fa. Vector Laboratories nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Detektion der CD3 und Foxp3 Antikörperbindung erfolgte wie bereits in Kapitel 2.2.3.4 beschrieben.

Die lichtmikroskopischen Analysen wurden mit einem Durchlicht-Mikroskop (Leica Microsystems GmbH) durchgeführt. Die totale Anzahl von Foxp3⁺ Tregs wurde pro Milz in 4-6 T-Zell Arealen der weißen Pulpa in 40-facher Vergrößerung bestimmt. Mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ v1.47 wurde für jede Milz die Anzahl Foxp3⁺ Tregs pro 1000 µm² (bezogen auf das CD3⁺ T-Zell Areal) quantifiziert.

2.2.4 Zellbiologische Methoden

2.2.4.1 Kultivierung von primären Zellen

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter einer Sterilbank mit laminarem Luftstrom durchgeführt, um Kontaminationen vorzubeugen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in entsprechendem B-Zell Medium (siehe Kapitel 2.1.7.1) in 24 oder 48 Well-Mikrotiterplatten (Greiner Bio-one GmbH) bei einer Temperatur von 37 °C und einem Kohlendioxid-Partialdruck von 5 % im Brutschrank.

2.2.4.2 Isolierung von primären Zellen der Milz und mesenterialen Lymphknoten

Zur Gewinnung von mononukleären Zellen (mononuclear cells, MNCs) wurde die, in Petrischalen (Ø 3,5 cm) und auf Eis gelagerte, Milz in 3 ml PBS mit zwei Pinzetten zerkleinert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf 10 ml Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Biosciences), mit einer Dichte von 1,077 g/ml, in einem 15 ml Falcon-Röhrchen überschichtet und ohne Bremse für 20 Minuten bei 800 x g zentrifugiert. Durch diese Dichtegradientenzentrifugation erfolgte die Separation der mononukleären Milzzellen. Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren aufgrund ihrer größeren Dichte, wohingegen MNCs sich in der Interphase sammeln. Die mononukleären Milzzellen wurden in ein neues 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, mit PBS gewaschen und bei 400 x g für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Es folgte eine Erythrozyten-Lyse mit 5 ml Lysepuffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit einem anschließenden Waschschriff mit PBS.

Mesenteriale Lymphknoten wurden nach dem gleichen Prinzip wie die Milz zerkleinert. Für die Isolation von primären Zellen wurde die Zellsuspension über Pre-Separation Filters (Miltenyi Biotec), mit einer Größe von 70 µm, gefiltert und anschließend mit PBS gewaschen.

2.2.4.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung gemischt, um die Zellzahl zu ermitteln. Tote Zellen färben sich dunkelblau, da der Trypanblaufarbstoff ungehindert durch die defekte Zellmembran dringen kann. So kann man tote Zellen von lebenden Zellen unterscheiden und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmen.

2.2.4.4 Magnetische Zellaufreinigung von murinen B-Zellen

Die Aufreinigung bzw. Anreicherung von mononukleären B-Zellen der Milz erfolgte zum einen unter Verwendung von CD45R (B220) oder CD43 (Ly-48) MicroBeads nach Protokoll der Herstellerfirma (Miltenyi Biotec). B220⁺ B-Zellen wurden mittels positiver Selektion aufgereinigt und für den in Kapitel 2.2.4.6 beschriebenen Zellproliferationsassay verwendet. Eine negative Selektion wurde hingegen verwendet, um CD43⁻ B-Zellen anzureichern. Dabei handelt es sich überwiegend um ruhende B-Zellen, die für den LPS und

IL-4 induzierten Immunglobulin-Klassenwechsel (siehe Kapitel 2.2.4.5 und 2.2.6.5) eingesetzt wurden.

Nach der Zellzahlbestimmung von mononukleären Milzzellen wurden diese zentrifugiert und in 90 μ l eisgekühltem MACS-Puffer pro 10^7 Zellen resuspendiert. Alle folgenden Schritte werden ebenfalls mit eisgekühltem MACS-Puffer durchgeführt. Die Markierung der Zellen mit 10 μ l paramagnetischen CD45R (B220) oder CD43 (Ly-48)-Beads pro 10^7 Zellen erfolgte für 15 Minuten bei 4 °C. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen in 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert und auf eine zuvor equilibrierte LS-Trennsäule, befestigt an einem Magnetfeld (MACS-Separator), pipettiert. Nachdem die mit paramagnetischen Beads markierten Zellen auf die Säule pipettiert wurden, bleiben diese in der Säulenmatrix hängen. Nicht markierte Zellen passierten dabei die Säule und wurden in 15 ml Falcon-Röhrchen aufgefangen (negative Selektion). Um alle restlichen, nicht markierten Zellen zu entfernen, wurde die Säule dreimal mit 500 μ l MACS-Puffer gewaschen. Außerhalb des Magnetfeldes wurde nun 5 ml MACS-Puffer auf die Säule pipettiert und mit Hilfe eines Stempels die nicht mehr magnetischen Zellen eluiert (positive Selektion).

2.2.4.5 *In vitro*-Stimulation von primären B-Zellen der Milz und primären mesenterialen Lymphknotenzellen

Für die Durchführung des Zellproliferationsassays (Kapitel 2.2.4.6) wurden die angereicherten B220⁺ B-Zellen in B-Zell Medium aufgenommen. 8×10^5 Zellen pro ml wurden für jeden Stimulationsansatz in eine 24 Well-Mikrotiterplatte ausgesät und für 48 Stunden mit LPS (7,5 μ g/ml), CpG 1826 Typ B (5 μ g/ml), anti-CD40 (10 μ g/ml) + IL-4 (10 ng/ml), anti-IgM (10 μ g/ml) im Brutschrank inkubiert. Parallel dazu wurde jeweils ein Ansatz ohne Stimulation inkubiert.

CD43⁺ B-Zellen (3×10^5 Zellen/ml) und primäre mesenteriale Lymphknotenzellen (1×10^6 Zellen/ml) wurden mit LPS (20 μ g/ml) sowie mit und ohne IL-4 (500 U) in einer 48 Well-Mikrotiterplatte in B-Zell Medium inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von vier Tagen wurden die Zellen auf Immunglobulin-Klassenwechsel Prozesse untersucht (Kapitel 2.2.6.5).

2.2.4.6 Zellproliferationsassay

2.2.4.6.1 BrdU-Assay

Für die Bestimmung des Zellwachstums wurde das kommerzielle FITC BrdU Flow Kit (BD Pharmingen) verwendet. BrdU (5-Bromo-2'-deoxyuridin) ist ein Analogon zu Thymidin, welches während der Synthesephase in die DNA eingebaut wird. Mit einem gegen BrdU gerichteten fluoreszenzmarkierten Antikörper ist es möglich, die neu synthetisierte DNA mittels Durchflusszytometrie zu detektieren.

30 Stunden nach Stimulation der murinen B220⁺ B-Zellen wurde BrdU, in einer Konzentration von 10 µM, auf die Zellen pipettiert. Nach weiteren 18 Stunden wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, für 5 Minuten bei 300 x g zentrifugiert, in je 1 ml Staining Buffer (2 % FCS in PBS) gewaschen und nochmals zentrifugiert. Die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen erfolgte mit jeweils 100 µl BD Cytofix/Cytoperm Buffer und anschließender Inkubation bei Raumtemperatur für 20 Minuten. Da das Assay aus technischen Gründen nicht komplett durchgeführt werden konnte, wurden die Zellen nach einem erneuten Waschschrift in Staining Buffer, in 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO und 90 % FCS) resuspendiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Nach Auftauen der Proben wurden diese in 1 ml Staining Buffer gewaschen und erneut in 100 µl BD Cytofix/Cytoperm Buffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschschrift in 1 ml 1 x BD Perm/Wash Buffer folgte eine einstündige Inkubation der Zellen mit je 100 µl DNase (300 µg/ml) bei 37 °C im Brutschrank. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit 50 µl des FITC gelabelten anti-BrdU Antikörpers (1:50 in 1 x BD Cytoperm/Wash Buffer) markiert, nochmals in 1 ml 1 x BD Cytoperm/Wash Buffer gewaschen und in 20 µl 7-Aminoactinomycin D (7-AAD, BD Bioscience) resuspendiert. Die Färbung mit 7-AAD ermöglicht die Bestimmung der Zellzyklusposition (G0/1-, S- und G2/M-Phase). Die Zellen wurden schließlich in 500 µl Staining Buffer aufgenommen und der prozentuale Anteil der S-Phase B-Zellen (BrdU⁺ Zellen) konnte mit Hilfe der durchflusszytometrischen Messung am LSR II (BD Bioscience) bestimmt werden.

2.2.5 Molekularbiologische Methoden

2.2.5.1 DNA-Isolation

2.2.5.1.1 DNA-Isolation aus Gewebe

Für die DNA Extraktion aus dem Mausschwanz wurde das in Kapitel 2.2.2.1 hergestellte Lysat für 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen, um gegebenenfalls Geweberückstände zu entfernen, und anschließend in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Dann folgte die DNA-Fällung mit 500 µl Isopropanol. Die DNA wurde schließlich unter Zentrifugation (20 Minuten, 13000 rpm) pelletiert, in 100-200 µl dH₂O gelöst und konnte bei -20 °C bis zur Genotypisierungs-PCR gelagert werden (siehe Kapitel 2.2.5.5.1, Seite 54).

2.2.5.1.2 DNA-Isolation aus FFPE-Gewebe

Die DNA-Isolation aus Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten (FFPE-) Mäusen fand unter Verwendung des NucleoSpin FFPE DNA Kit der Firma Macherey-Nagel GmbH (Düren) statt. Für die DNA Extraktion durften pro Probe maximal 15 mg Paraffin und 5 mg Gewebe eingesetzt werden.

Das Lösen der FFPE-Mägen fand bei 60 °C für 3 Minuten im Thermomixer (Eppendorf AG) unter Zugabe von 400 µl „Paraffin-Dissolver“ und anschließendem Vortexen statt. Die Proben wurden auf Raumtemperatur gekühlt, mit 100 µl FL Puffer gemischt und für 1 Minute bei 11000 x g zentrifugiert. Dadurch entstanden zwei Phasen, wobei die obere, organische Phase verworfen wurde. Die untere, wässrige Phase, in der sich ausschließlich das Gewebematerial befand, wurde mit 10 µl Proteinase K versetzt, gemischt und für 3 Stunden bei Raumtemperatur lysiert. Um einer DNA-Quervernetzung gegenzusteuern (verursacht durch die im Formalin enthaltenen Chemikalien), wurde 100 µl D-Link Puffer (Decrosslink Buffer) zugegeben, gemischt, bei 11000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert und für 30 Minuten bei 90 °C im Thermomixer erhitzt. Anschließend wurde jede Probe mit 200 µl EtOH abs. unter Vortexen gemischt, erneut bei 11000 x g für 1 Minute zentrifugiert und die untere, wässrige Phase in eine NucleoSpin® FFPE DNA Säule pipettiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 30 Sekunden bei 2000 x g wurde die Silica-Membran der Säule zweimal mit 400 µl Puffer B5 gewaschen. Der letzte Zentrifugationsschritt diente dem Trocknen der Membran und fand bei 11000 x g für 2 Minuten statt. 20 µl BE Elutionspuffer

wurden direkt auf die Membran pipettiert und die DNA für 30 Sekunden bei 11000 x g eluiert. Die Lagerung fand bis zur weiteren Verwendung (siehe Kapitel 2.2.5.7, Seite 56) bei -20 °C statt.

2.2.5.1.3 DNA-Isolation aus *H. felis*

Zur DNA Extraktion aus *H. felis* wurde das DNeasy Blood & Tissue Kit der Firma Qiagen GmbH (Hilden) mit dem Protokoll für gramnegative Bakterien verwendet. Wie bereits in Kapitel 2.2.1 beschrieben, wurden die *H. felis* Bakterienkolonien in PBS geerntet und für 10 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 180 µl Lysepuffer und 20 µl Proteinase K für 1 Stunde bei 56 °C im Thermomixer (Eppendorf AG) inkubiert. Nacheinander wurden 200 µl Puffer AL (Qiagen GmbH, Hilden) und 200 µl EtOH abs. zugegeben und unter Vortexen gemischt.

Das Lysat wurde auf eine DNeasy Mini Spin Säule pipettiert und für 1 Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 500 µl AW1 und 500 µl AW2 wurde die Säule mit einer 3-minütigen Zentrifugation bei 8000 x g getrocknet. Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, die Silica-Membran mit 50 µl AE Elutionspuffer für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und 1 Minute bei 8000 x g zentrifugiert. Die DNA konnte bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

2.2.5.2 RNA-Isolation aus murinem Blut

Für die Aufreinigung totaler RNA aus peripherem Blut der Schwanzvene wurde das vom Hersteller geforderte Volumen in ein mit Erythrozyten-Lysepuffer befülltes RNAprotect Animal Blood Tube, der Firma Qiagen GmbH, getropft. Nach Mischen erfolgte die Lyse für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Bis zur weiteren Aufarbeitung konnten die Proben bei -20 °C eingefroren werden.

Die RNA Extraktion erfolgte schließlich mit dem RNeasy® Protect Animal Blood Kit von Qiagen GmbH nach Herstelleranleitung. Die lysierten Proben wurden für 3 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert und mit 1 ml RNase freiem Wasser gewaschen. Nach erneutem Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 240 µl RSB-Puffer resuspendiert und mit 200 µl RBT-Puffer und 20 µl Proteinase K für 10 Minuten bei 55 °C im Thermomixer (800 rpm) verdaut. Das Lysat wurde mit Hilfe eines QIAshredders (Qiagen GmbH) für 3 Minuten bei 20000 x g homogenisiert, in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 240 µl

EtOH gemischt. Nach der RNA Bindung an einer RNeasy MinElute Säule (Qiagen GmbH), und einem anschließenden Waschschriff mit 350 µl RW1-Puffer, erfolgte der DNA-Verdau mit 80 µl DNase I Reaktionsmix (RNase-free DNase Set, Qiagen GmbH) für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einer Serie von Waschschriffen, mit RW1- und RPE-Puffer sowie 80%igem EtOH, wurde die Membran in einem 5-minütigen Zentrifugationsschriff komplett getrocknet. Die Elution der RNA erfolgte in 25 µl Elutionspuffer (REB-Puffer, Qiagen GmbH).

2.2.5.3 Bestimmung der Nukleinsäuekonzentration

Die Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren erfolgte mit einem Mikrovolumen Spektralphotometer, dem NanoDrop™ 1000 (PeqLab Biotechnology). Dafür wurden 1,5 µl des Leerwertes oder der unverdünnten Probe auf die Messoberfläche pipettiert. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Computers. Verwendet wurde hierbei die Software ND-1000 V3.7.1.

2.2.5.4 Reverse Transkription

Um die Expression eines Gens auf RNA-Ebene untersuchen zu können, muss die RNA zunächst mittels reverser Transkription in komplementäre DNA (cDNA, *complementary DNA*) umgeschrieben werden. Verwendet wurde hierbei das Omniscript® Reverse Transcription Kit der Firma Qiagen, welches neben dem Enzym *reverse Transkriptase*, 10 x RT-Puffer, dNTP-Mix sowie RNase freies Wasser enthält. Random Hexamer Primer (Fermentas) sowie der RNase Inhibitor (Promega GmbH) müssen hinzugefügt werden. Zufällige Hexamer Primer (random hexamers) sind in der Lage, an vielen verschiedenen Bereichen der RNA zu hybridisieren und mit Hilfe der reversen Transkriptase den zu dem RNA-Strang komplementären cDNA-Strang zu synthetisieren.

Umgeschrieben wurde jeweils 1 µg RNA. Das RNA Template wurde mit 2,075 µl 10 x RT-Puffer, 2 µl dNTP Mix [5 mM jedes dNTP], 2 µl Random Hexamer Primer [10 µM], 0,25 µl RNase Inhibitor [40 U/µl] und 1 µl Omniscript® reverse Transkriptase zusammenpipettiert. Mit RNase freiem H₂O wurde jeder Ansatz auf 20 µl aufgefüllt.

Die cDNA-Synthese erfolgte bei 37 °C für 1 Stunde im Heizblock. Durch eine 5-minütige Inkubation der Proben bei 93 °C wurde die reverse Transkriptase hitzeinaktiviert. Im Anschluss wurden die cDNA direkt auf Eis gestellt. Eine Lagerung war bei -20 °C möglich.

2.2.5.5 Qualitative Polymerase-Kettenreaktion

Die herkömmliche Polymerase-Kettenreaktion wurde mit dem GeneAmp® PCR Reagent Kit und der AmpliTaq® DNA Polymerase der Firma Applied Biosystems in einem Thermocycler Gradient (Eppendorf AG) durchgeführt. Hierbei werden mit Hilfe der DNA-Polymerase bestimmte Bereiche der cDNA amplifiziert. Diese Bereiche werden durch einen spezifischen „forward“-Primer und einen spezifischen „reverse“-Primer eingegrenzt. Die thermostabile Taq-Polymerase, aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*, bindet an das freie 3'-OH-Ende des Primers und kann somit den jeweiligen komplementären DNA-Strang in 5'-3'-Richtung durch Einbau von Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) neu synthetisieren.

Verwendet wurden 1 µl cDNA, die mit 2,5 µl 10 x Puffer, 1 µl dNTP Mix [10 mM jedes dNTP], 1 µl *forward* Primer [10 µM], 1 µl *reverse* Primer [10 µM] und 0,2 µl Taq-Polymerase [5 U/µl] gemischt wurden. Mit H₂O wurde jede Probe auf 25 µl aufgefüllt.

Die Parameter bzw. das Amplifikationsprotokoll der PCR ist in Tabelle 10 dargestellt, wobei die Annealing-Temperatur von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer abhängig ist (siehe Tabelle 3, Seite 32). Eine mehrfache Wiederholung der Zyklenzahl (Denaturierung, Annealing und Elongation) führt zu einer großen Menge an PCR-Produkt, welches in der Agarose-Gelelektrophorese (Kapitel 2.2.5.9) ausgewertet werden kann.

Tabelle 10: Programm der qualitativen PCR.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Inkubationszeit [min]
Initiale Denaturierung	94	4:00
Denaturierung	94	0:45
Annealing	55 - 65	0:45
Elongation	72	1:00
Terminale Elongation	72	5:30
Kühlung	20	∞

} x 40 Zyklen

2.2.5.5.1 Genotypisierungs-PCR

Für die Genotypisierungs-PCR der Mäuse wurde die aus der Schwanzspitze isolierte genomische DNA (100-200 ng) verwendet. Die Ansätze der PCR wurden, wie bereits in Kapitel 2.2.5.5 beschrieben, pipettiert und durchliefen das in Tabelle 10 dargestellte Programm.

Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4 dargestellt. Für die Genotypisierung der *Ali5*-Mäuse wurden die Primer „*m.PLCg2-SL1.for*“ und „*m.PLCg2-SR2.rev*“ verwendet. Nach PCR wurden die Produkte in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und mit 1 µl *HincII*, einem Restriktionsenzym, gemischt und für 2-3 Stunden bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Durch die *HincII* Restriktionsstelle lassen sich Rückschlüsse auf den Genotyp schließen. Somit weisen WT Mäuse zwei Banden (350 bp und 156 bp) und *Plcg2*^{*Ali5/+*} Mäuse drei Banden (506 bp, 350 bp und 156 bp) im Agarosegel auf.

2.2.5.6 Quantitative Real-Time PCR

Bei der quantitativen PCR (qPCR) handelt es sich um eine Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion, bei der die Amplifikation der PCR-Produkte in Echtzeit gemessen werden. Die qPCR bietet eine Möglichkeit der Quantifizierung, die auf dem Prinzip von fluoreszierenden Farbstoffen beruht. Das hier verwendete SYBR Green I bindet an den DNA-Doppelstrang und emittiert bei einer Wellenlänge von 521 nm. Die Messung der Fluoreszenz findet am Ende der Extensionsphase jedes Zyklus statt, da zu diesem Zeitpunkt die DNA doppelsträngig vorliegt. Dadurch wird eine graphische Darstellung der Amplifikation ermöglicht. Im Verlauf der PCR nimmt die Menge an PCR-Produkt zu und ist proportional zu der gemessenen Fluoreszenz.

Für die qPCR wurde das QuantiTect® SYBR® Green PCR Kit von Qiagen verwendet. Zusätzlich lief zu jedem qPCR-Lauf und zu jedem zu analysierenden Gen eine Negativkontrolle (ohne cDNA) mit. Die Ansätze (1 µl cDNA, 12,5 µl 2 x QuantiTect SYBR Green Master Mix, 0,75 µl *forward* Primer [10 µM], 0,75 µl *reverse* Primer [10 µM], 10 µl RNase freies H₂O) wurden in Dreifachbestimmung in Polypropylen PCR-Platten (Greiner Bio-one GmbH) pipettiert und mit den dazugehörigen Deckelstrips verschlossen. Die Durchführung der qPCR erfolgte im Mastercycler® ep realplex 2 S (Eppendorf AG) mit den in Tabelle 11 aufgeführten Konditionen. Die Annealing-Temperatur ist, wie in der qualitativen PCR, abhängig von der Schmelztemperatur [*T_m*] der verwendeten Primer.

Da jedes PCR-Produkt seine spezifische Schmelztemperatur hat, wurde im Anschluss an die qPCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dadurch ist es möglich eventuell vorhandene Kontaminationen oder unspezifische PCR-Produkte von spezifischen PCR-Produkten zu unterscheiden.

Tabelle 11: Programm der quantitativen Real-time PCR.

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Inkubationszeit [min]	
Initiale Denaturierung	95	15:00	
Denaturierung	94	0:15	} x 40 Zyklen
Annealing	55 - 60	0:30	
Extension	72	0:30	
Schmelzkurve	95	0:15	} Erhitzungsphase 20:00 min
	55 - 60	0:15	
	95	0:15	
Kühlung	4	∞	

Bei der qPCR wird die relative Quantifizierung bestimmt. Voraussetzung dafür ist die Normalisierung der Expression der Zielgene mit einem nicht regulierten Referenzgen (*housekeeping gene*). Durch die Normalisierung wird der Fehler der Expressionsergebnisse reduziert, da diese sowohl bei dem Zielgen, als auch bei dem Referenzgen auftreten. Das in dieser Arbeit verwendete Referenzgen war GAPDH. Für die Auswertung der qPCR ist der Ct (*Cycle-threshold*)-Wert von großer Bedeutung. Der Ct-Wert ist ein Maß für die Quantifizierung der Startmenge und wird zu Beginn der exponentiellen Phase der PCR-Amplifikation gemessen. Dabei steht der Ct-Wert in Beziehung zur eingesetzten cDNA, da bei einem niedrigen Wert eine hohe DNA-Ausgangsmenge vorliegt und umgekehrt.

Verschiedene Faktoren können allerdings Einfluss auf die Amplifikationseffizienzen haben. Darunter zählen u. a. die Primerlänge oder das Primerannealing sowie die Ausgangskonzentration der Templates. Aus diesem Grund wurde vor Beginn der eigentlichen Versuche die Amplifikationseffizienz, mit Hilfe einer Standardkurve, für jedes Gen bestimmt. In Zweifachbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe einer Referenz-cDNA erstellt, deren Ct-Wert logarithmisch (Y-Achse) gegen die Konzentration (X-Achse) aufgetragen wurde.

2.2.5.7 *H. felis* 16S rDNA basierte PCR

2.2.5.7.1 *H. felis* 16S rDNA-Nachweis mittels qualitativer PCR

Für den Nachweis einer *H. felis*-Infektion dient die bakterielle, ribosomale 16S DNA (16S rDNA). Um die Infektion der Mäuse zu bestätigen (*post-mortem*), wurde DNA aus Formalin-

fixierten und Paraffin-eingebetteten Mägen isoliert (Kapitel 2.2.5.1.2, Seite 51) und die bakterielle 16S rDNA mittels qualitativer PCR nachgewiesen. Mit Hilfe der Primer „CAR557.for“ und „CAR636.rev“, die sowohl spezifisch für *H. felis* als auch für *H. bizzozeronii* und *H. salomonis* sind (De Groote et al., 2001), wurden die Proben auf Vorhandensein des 78 bp großen bakteriellen DNA-Fragments überprüft. Die PCR wurde wie in Kapitel 2.2.5.5 beschrieben durchgeführt.

2.2.5.7.2 Einschätzung der *H. felis* Kolonisationsrate mittels quantitativer PCR

Für die Beurteilung der Kolonisationsrate von *H. felis* im Mausmagen wurden ebenfalls die durch Groote et al. (2001) beschriebenen „CAR557.for“ und „CAR636.rev“ Primer verwendet. Die Methodik sowie die Berechnung der Kolonisationsrate wurde bereits von Mutters et al. beschrieben (Mutters et al., 2009). 1×10^7 Bakterien wurden in einem Volumen von 100 µl H₂O für 10 min bei 56 °C im Heizblock hitzeinaktiviert. Für die Standardkurve wurden die inaktivierten Bakterien in einer 1:10 Verdünnung (10^2 bis 10^7 Bakterien pro ml) verwendet sowie 900 ng DNA der Mausmägen, wobei jede Probe in Triplikaten analysiert wurde. Die qPCR wurde ausgeführt wie in Kapitel 2.2.5.6 und Tabelle 11 beschrieben.

2.2.5.8 RT² Profiler PCR Array

Mit Hilfe eines RT² Profiler PCR Arrays (SABioscience/Qiagen GmbH) konnte die Expression von inflammatorischen Genen untersucht werden. Das PCR Array umfasst die Methode einer quantitativen Real-time PCR. Mit einem selbst konstruierten Array konnten 91 unterschiedliche Gene auf einer 96-Well Platte gleichzeitig untersucht werden (siehe Anhang, Abbildung 17), wobei in jedem Well verschiedene Primer für die qPCR des zu untersuchenden Gens aufgebracht waren. Zusätzlich wurden drei weitere Kontrollen untersucht, die eine Effizienz für das Array darstellten. Die Kontrolle der genomischen DNA (MGDC, mouse genomic DNA control) ermittelt dabei DNA-Kontaminationen, die Kontrolle der reversen Transkription (RTC, reverse transcription control) testet die Effizienz der cDNA-Synthese und die positive PCR-Kontrolle (PPC, positive PCR control) überprüft die Effektivität der PCR. Zur Normalisierung der Proben wurde ebenfalls GAPDH und β-Actin auf die Platte aufgebracht.

Das für den RT² Profiler PCR Array verwendete Material bzw. RNA stammte aus dem peripherem Blut der Mausgruppe 1 mit einer Infektionszeit von 6 Monaten. Die cDNA-Synthese fand mit dem RT² First Strand Kit (SABioscience/Qiagen GmbH) nach Herstelleranleitung statt. Der erste Schritt bestand jedoch in der Entfernung restlicher genomischer DNA. Dazu wurde 1 µg RNA mit 2 µl GE-Puffer gemischt und mit RNase freiem H₂O auf 10 µl aufgefüllt. Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei 42 °C im Heizblock wurden die Proben für mindestens 1 Minute auf Eis gestellt und anschließend für die cDNA-Synthese mit jeweils 4 µl 5 x BC3-Puffer, 1 µl P2 Kontrolle, 2 µl RE3 Reverse Transkriptase Mix und 3 µl RNase freiem H₂O gemischt. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 15 Minuten bei 42 °C wurde die Reaktion bei 95 °C für 5 Minuten gestoppt und mit 91 µl RNase freiem H₂O gemischt. Die cDNA konnte bei -20 °C gelagert werden.

Für den PCR Array wurde schließlich ein Mix aus 1350 µl 2 x RT² SYBR Green Mastermix, 102 µl cDNA und 1248 µl RNase freiem H₂O hergestellt und jeweils 25 µl in jedes Well der 96-Well Platte pipettiert. Das Programm im Mastercycler® ep realplex 2 S (Eppendorf AG) lief mit den in Tabelle 12 aufgeführten Konditionen. Die Auswertung der Ergebnisse (Ct-Werte) fand mit der webbasierten Software von SABiosciences/Qiagen GmbH (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) statt.

Tabelle 12: Programm des RT² Profiler Arrays.

PCR Array Schritt	Temperatur [°C]	Inkubationszeit [min]
Aktivierung der Taq-Polymerase	95	10:00
Denaturierung	95	0:15
Annealing / Extension	60	1:00
} x 40 Zyklen		
Schmelzkurve	95	0:15
	55 - 60	0:15
	95	0:15
		} Erhitzungsphase
		20:00 min
Kühlung	4	∞

2.2.5.9 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle sind aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats negativ geladen und wandern somit im elektrischen Feld zur Anode. Die Auftrennung der DNA-Fragmente in der Agarosematrix erfolgt ihrer Größe nach. Die Porengröße der Matrix variiert je nach

eingesetzter Konzentration der Agarose, die je nach gewünschtem Auftrennungsbereich bestimmt wird.

Das Agarosegel wird mit Ethidiumbromid versetzt, welches zwischen den einzelnen Basenpaaren des DNA-Doppelstranges interkaliert. Das Ethidiumbromid fluoresziert unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 245 nm. Somit werden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht. Für eine Größenordnung der DNA-Fragmente wird zusätzlich ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen.

Die Agarose (Agarose Ultra Pure™, Invitrogen GmbH) wurde in 1 x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst. Nach kurzem Abkühlen wurde das Gel mit Ethidiumbromid versetzt, in den Gelschlitten gegossen und mit Probenkämme versehen. Nach dem Auspolymerisieren, wurde der Schlitten in die horizontale Elektrophoresekammer (Bio-Rad Laboratories GmbH) gelegt, mit 1 x TAE-Puffer bedeckt und anschließend die Probenkämme entfernt. Die mit Laufpuffer (Orange DNA Loading Dye 6 x, Fermentas) versetzten Proben sowie der Molekulargewichtsmarker (O`Gene Ruler™ DNA Ladder, Fermentas) wurden nun in die Taschen des Gels pipettiert. Das Gel lief mit konstanter Spannung von 10 V/cm (Power Supply EV231, PeqLab Biotechnology), bis die Proben das Ende des Gels erreichten. Unter dem UV-Transilluminator (PeqLab Biotechnology) wurden die Gele ausgewertet und fotografisch festgehalten.

2.2.5.10 Klonierung und Transformation

Für die Klonierung von PCR-Produkten (aus dem RT² Profiler PCR Array) wurde das TOPO® TA Cloning® Kit mit dem pCR 2.1 TA Cloning Vektor (Invitrogen GmbH) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Das Besondere an dem bereits vorliegenden linearisierten Vektor sind die einzelnen Desoxythymidin (T)-Überhänge am 3'-Ende. Die PCR-Produkte besitzen einen Desoxyadenosin (A)-Überhang am 3'-Ende, wodurch eine Ligation von Vektor und PCR-Produkt, mit Hilfe der kovalenten Bindung des Enzyms Topoisomerase I an dem Vektor, ermöglicht wird. Bei der Klonierung werden also DNA-Abschnitte in einen Vektor eingebaut, der wiederum in Wirtszellen (*E. coli*) eingeschleust bzw. transformiert und vermehrt wird.

Für die Klonierung wurden verschiedene PCR-Produkte (IL-1a, IFN γ , S100A8 und TNFRSF13C) des RT² Profiler PCR Array verwendet. Dafür wurden 3 μ l PCR-Produkt, 1 μ l 10 x Ligations-Puffer, 2 μ l pCR 2.1 TA Cloning Vektor und 1 μ l T4 DNA-Ligase zusammenpipettiert und mit H₂O auf 10 μ l aufgefüllt. Inkubiert wurden die Ansätze über Nacht bei 14 °C im

Thermomixer (Eppendorf AG). Nach Ligation konnten die Ansätze bei -20 °C gelagert werden oder direkt für die Transformation in kompetente Zellen eingesetzt werden. Die Einschleusung fremder DNA in kompetente Zellen erfolgt durch Hitzeschock, wobei die Zellmembran kurzzeitig für DNA-Moleküle durchlässig wird. Die kompetenten *E. coli One Shot TOP10* Zellen (Invitrogen GmbH) wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 µl der Klonierungsreaktion gemischt. Der Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 Sekunden bei 42 °C im Wasserbad. Nachdem die Proben für 1 Minute auf Eis abgekühlt wurden, wurde 250 µl SOC-Medium zugegeben und die Zellen für 1 Stunde bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. 100 µl der Zellen wurden nun jeweils auf eine LB-Ampicillin-Platte ausplattiert und bei 37 °C über Nacht in einem Inkubationsschüttler (Innova® 4000 NBS, Edison) inkubiert. Der pCR 2.1 TA Cloning Vektor besitzt eine Kanamycin- und Ampicillin-Resistenz, womit nur bei erfolgreicher Transformation eine Koloniebildung, auf den mit Antibiotika versetzten Platten, gewährleistet wird.

2.2.5.11 Plasmidpräparation und Sequenzierung

Das Animpfen von Flüssigkulturen erfolgte durch Überführen einzelner auf der Agarplatte gewachsener Kolonien in ein mit 3 ml LB-Medium befülltes 15 ml Falcon-Röhrchen unter Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C und 200 rpm im Inkubationsschüttler inkubiert.

Die Plasmidpräparation beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse und wurde mit dem NucleoBond® PC Plasmid Mini Kit (Macherey-Nagel GmbH) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Nach Zentrifugation der Ansätze für 15 Minuten bei 6000 x g und 4 °C wurde das Zellpellet in 400 µl S1-Puffer (versetzt mit RNase) resuspendiert und anschließend mit 400 µl Lysepuffer S2 (200 mM NaOH und 1 % SDS) versetzt, vorsichtig gemischt und für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. SDS hat die Funktion, die Zellmembran zu schädigen, indem es den Phospholipid- und Proteinanteil aus der Membran herauslöst und dadurch die Freisetzung des Zellinhaltes ermöglicht. Das NaOH wiederum führt zur Denaturierung von Proteinen, chromosomaler- und Plasmid-DNA.

Nach Zugabe von 400 µl Neutralisierungspuffer (S3) und sofortigem Mischen fielen genomische DNA, Zelltrümmer, SDS und Proteine aus, wohingegen die Plasmid-DNA zurück in ihre Ausgangsform gebracht wurde bzw. renaturierte. Nach einer 5-minütigen Inkubation

auf Eis wurde das Lysat durch Zentrifugation (10 Minuten, 12000 x g, 4 °C) geklärt und anschließend auf eine bereits mit Puffer N2 equilibrierte NucleoBond® AX20 Mini Säule pipettiert. Dabei handelt es sich um eine Anionenaustauschsäule, welche die Plasmid-DNA, aufgrund ihrer negativen Ladung, binden kann. Degradierete RNA, SDS-Präzipitate und Proteine passieren die Säule. Nach zweimaligem Waschschrift, mit jeweils 2 ml N3-Puffer, wurde die DNA in Puffer N5 eluiert. Durch Zugabe von 750 µl Isopropanol erfolgte die Fällung der DNA. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 15000 x g für 30 Minuten und 4 °C wurde das DNA-Pellet mit 70%igem EtOH gewaschen, erneut zentrifugiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet, bevor es in 30 µl dH₂O aufgenommen wurde. Nach einer Konzentrationsbestimmung mit dem NanoDrop™ 1000 (PeqLab), wurde die DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Sequenzierung der DNA-Proben wurde durch die Firma SeqLab (Göttingen) unter Verwendung der Sequenzier-Primer T7-Promotor und M13 reverse durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen wurde mit dem Internetprogramm BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) vollzogen.

2.2.6 Proteinbiochemische und immunologische Methoden

2.2.6.1 Proteinisolation aus *Helicobacter felis*

Für den *Helicobacter*-spezifischen ELISA (siehe Kapitel 2.2.6.4, Seite 63) wurden Proteinlysate aus *H. felis* mit der Ready-Lyse Lysozyme Solution (Epicentre Biotechnologies) hergestellt. Dafür wurden die Bakterien, wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben, mit einem Tupfer in PBS geerntet und auf einen OD-Wert von 1,0 eingestellt. Nach Zentrifugation bei 3000 x g für 10 Minuten wurde das Pellet in 25 µl TES-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 1 µl Ready-Lyse-Lysozyme Solution, und einer 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, konnten die Zellwände der Bakterien aufgeschlossen werden. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 20000 x g für 10 Minuten bei 4 °C wurden die Überstände gepoolt in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt und konnten nach Bestimmung der Proteinkonzentration bei -80 °C gelagert werden.

2.2.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das kommerziell erhältliche BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay Kit der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet.

Das BCA Assay beruht auf dem Prinzip der Kupferreduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} durch Bindung von Proteinen in einem basischen Milieu. In der sogenannten Biuret-Reaktion bildet sich ein Chelatkomplex aus mehreren Aminosäureresten der Peptide und Kupfer, der sich in einer hellblauen Farbe bemerkbar macht. Das freigesetzte Kupferkation (Cu^{1+}) reagiert nun mit zwei BCA Molekülen zu einem weiteren Chelatkomplex, wobei eine intensive violette Farbe entsteht, die proportional zu der in der Probe befindlichen Proteinkonzentration ist.

Dazu wurde zunächst, in einer transparenten 96-Well Mikrotiterplatte, 25 μl der zu vermessenden Proben (Verdünnung 1:10 in Aqua dest.) sowie Rinderserumalbumin-Standards (2000 $\mu\text{g/ml}$ bis 25 $\mu\text{g/ml}$ BSA in Aqua dest.) und die Negativkontrolle in Doppelansätzen vorgelegt. Anschließend wurden 200 μl BCA Working Reagent A+B (50:1, Reagent A:B) in die Wells pipettiert und für 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte bei 540 nm am ELISA Reader (Sunrise™ Absorbance Reader, TECAN Group Ltd., Männedorf). Mit Hilfe der erstellten BSA Eichgerade konnte die Konzentration der Proteinmenge in der Probe ermittelt werden.

2.2.6.3 Immunglobulin-ELISA

Mit Hilfe eines ELISAs (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) können Proteine, Hormone oder Toxine in einer Probe nachgewiesen und deren Konzentration bestimmt werden. Bei dieser Methode binden spezifische Antikörper an das nachzuweisende Antigen. Diese Antikörper sind mit einem Enzym markiert, das eine Farbreaktion katalysiert, die proportional zu der in der Probe enthaltenen Konzentration ist.

Die kompletten Experimente und Auswertungen wurden im Institut für Laboratoriumsmedizin, Pathobiochemie und Molekulare Diagnostik (BMFZ, Marburg) durchgeführt. Die verwendeten Serumproben stammten von Mausgruppe 5. 12 Wochen nach *H. felis*-Infektion wurde peripheres Blut aus der Schwanzvene entnommen und Serum isoliert.

Für die Bestimmung der Gesamt-IgG1- und IgG2a-Konzentration im Serum der Mäuse wurde in einer 96-Well Mikrotiterplatten (Nunc) 50 μl verdünnter Primärantikörper pro Well bei 4 °C über Nacht inkubiert [IgG1 (BD Pharmingen): 8 $\mu\text{g/ml}$ in 0,1 M NaHCO_3 ; IgG2a

(BD Pharmingen): 8 µg/ml in 0,1 M NaHCO₃]. Die Platten wurden viermal mit Waschpuffer [0,1 % Tween 20 in PBS], mit Hilfe eines 96-Well Mikrotiter Waschgeräts, gewaschen und, um unspezifische Bindungen zu blockieren, mit 100 µl Blocking-Puffer [1 % BSA in PBS] für 2-4 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler (IKA-Schüttler MTS4, IKA®-Labortechnik) inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschen wurde die Standardreihe in einer 1:2 Verdünnung angesetzt [höchste Standardkonzentration: IgG1 (BD Pharmingen) 200 ng/ml, IgG2a (BD Pharmingen) 300 ng/ml].

Die Verdünnung der Serumproben erfolgte mit Waschpuffer [IgG₁: 1:5000; IgG_{2a}: 1:2000] und wurden in Doppelbestimmung zu je 50 µl pro Well aufgetragen. Für die Leerwertbestimmung wurde ebenfalls Waschpuffer verwendet. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden die Platten mit Waschpuffer gewaschen und mit biotinyliertem Zweitantikörper [Biotin rat anti-mouse IgG1, IgG2a (BD Pharmingen) jeweils 1:200 in Waschpuffer] zu je 50 µl pro Well, für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach erneutem viermaligen Waschschrift folgte eine 30-minütige Inkubation mit 50 µl pro Well einer 1:1000 in Waschpuffer verdünnten Streptavidin-Peroxidase (Sigma-Aldrich) in abgedunkelter Umgebung. Nachdem die Platten achtmal gewaschen wurden, wurde 100 µl Peroxidase-Substratlösung (BM Blue POD Substrate, Roche) aufgetragen und im Dunkeln inkubiert. Sobald das Substrat 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) der BM Blue POD Substratlösung (Roche) mit je 100 µl pro Well pipettiert wurde, beginnt die Streptavidin-Peroxidase das TMB zu oxidieren. Eine Blaufärbung verweist hierbei auf die Reaktion. Erst bei einer deutlich sichtbaren Abstufung der entstandenen Blaufärbung wurde die Reaktion mit 50 µl 2 M H₂SO₄ gestoppt, wodurch es zu einem Farbumschlag von blau zu gelb kam. Die Messung der Absorption erfolgte bei 450 nm mit dem ELISA-Reader Sunrise (TECAN GmbH); die Auswertung der Daten mit der ELISA-Software Magellan 3.0 (TECAN GmbH).

2.2.6.4 *H. felis*-spezifischer Immunglobulin-ELISA

Um einen *H. felis*-spezifischen ELISA durchführen zu können, wurde im ersten Schritt, wie in Kapitel 2.2.6.1 beschrieben, Proteine aus dem Bakterium isoliert. Für die Beschichtung der 96-Well Mikrotiterplatten wurden 50 µl Proteinlysate pro Well [10 µg/ml in NaHCO₃] bei 4 °C über Nacht inkubiert. Es folgte ein viermaliger Waschschrift (s.o.), gefolgt von dem Blocken der Platte mit 100 µl Blocking-Puffer für 2-4 Stunden. Nach einem erneuten Waschschrift

wurde im Anschluss die Standardkurve (Serumpool) sowie die Serumproben in Doppelbestimmung zu je 50 µl pro Well aufgetragen. Die Verdünnung der Serumproben erfolgte mit Waschpuffer [IgG1: 1:100; IgG2a: 1:10]. Als Standardreihe diente Serum aller in Gruppe 5 verwendeten infizierten Mäuse (Serumpool). Die Standardkurve wurde ebenfalls mit Waschpuffer verdünnt und betrug für IgG1 als auch für IgG2a: 1:8 - 1:2.621.440 in einer 1:4 Verdünnung. Für die Leerwertbestimmung wurde Waschpuffer verwendet. Nach Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden die Platten mit Waschpuffer gewaschen und mit biotinyliertem Zweitantikörper [Biotin rat anti-mouse IgG1 und IgG2a (BD Pharmingen) jeweils 1:200 in Waschpuffer] zu je 50 µl pro Well für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach einem viermaligen Waschschrift erfolgte die weitere Durchführung des ELISAs (vgl. Kapitel 2.2.6.3). Die Bestimmung der *H. felis*-spezifischen Immunglobulin Konzentration erfolgte anhand des Serumpools und wurde in Labor Units/ml [LU/ml] angegeben. Dabei wurde der erste Standard willkürlich auf 10 LU/ml gesetzt.

2.2.6.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie oder auch FACS (engl.: *fluorescence activated cell sorting*)-Analyse ist eine Methode, bei der Zelloberflächenmoleküle sowie intrazelluläre Proteine bestimmt werden können. Durch die Verwendung von fluoreszierenden Farbstoffen, die durch eine Antigen-Antikörper-Reaktion an die Oberflächenmarker der Zellen binden, können die verschiedenen Zellpopulationen detektiert werden. Die mit fluoreszierenden Antikörpern markierten Zellen befinden sich in Suspension und werden durch ihre Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zellsuspension wird durch eine Kapillare in den Messbereich gesaugt. Dort wird jede Zelle einzeln durch einen einfallenden Laserstrahl angeregt. Durch unterschiedliche Streuung des Lichts, aufgrund verschiedener Zelleigenschaften (Strukturen der Zellmembran, intrazelluläre Bestandteile), können die Zellen nach ihrer Größe (Vorwärtsstreulicht, engl.: *forward scatter* = FSC) und ihrer Granularität (Seitwärtsstreulicht, engl.: *side scatter* = SSC) mit Hilfe von geeigneten Detektoren nachgewiesen werden. Zusätzlich zu der Streuung wird das emittierte Fluoreszenzlicht der Antikörper-gekoppelten Fluorophore detektiert.

Die Antikörperfärbung für den LPS und IL-4 induzierten Klassenwechsel von B-Zellen zu IgG1 (IgG1 - APC und CD45R/B220 - PE) erfolgte für 30 Minuten bei 4 °C im Kühlschrank. Alle

Antikörper wurden in Staining-Puffer (2 % FCS in PBS) unter denen in Kapitel 2.1.9, Tabelle 6, angegebenen Verdünnungen eingesetzt. Vor der Analyse am LSRII (BD Biosciences) wurden die Zellen ein weiteres Mal gewaschen und in 300 µl PBS resuspendiert. Zellen ohne Antikörperfärbung waren die dazugehörige Negativkontrolle.

Um die prozentuale Verteilung von Tregs in *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen zu bestimmen, wurden primäre mononukleäre Zellen der Milz von uninfizierten Mäusen (n = 4 pro Genotyp) mit dem *Regulatory T cell Staining Kit #2* (CD4 - FITC, CD25 - PE, Foxp3 - APC) nach Herstelleranleitung gefärbt. Für die Bestimmung von CD73⁺ Tregs wurde zusätzlich zum *Regulatory T cell Staining Kit #2* ein eFluor450-konjugierter CD73 Antikörper (Affymetrix – eBioscience) nach Herstellerprotokoll verwendet. Als Negativkontrolle wurden auch hier Zellen ohne Antikörper behandelt.

Alle FACS-Messungen dieser Arbeit wurden am LSRII (BD Biosciences) verrichtet. Die Auswertungen erfolgten mit der FlowJo Software Version 7.6 (Tree Star, Inc.).

2.2.7 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen und Graphen wurden mit der GraphPad Prism®-Software Version 5.01 (GraphPad Software Inc.) durchgeführt und die Signifikanz mit Hilfe des t-Tests für ungepaarte Stichproben oder mit Hilfe des Mann-Whitney U-Tests ermittelt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert (MW) ± Standardfehler (SEM, *standard error of the mean*) angegeben.

Die Ergebnisse des RT² Profiler PCR Arrays wurden mit der webbasierten Software von SABiosciences/Qiagen GmbH (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) mit Hilfe eines t-Tests berechnet. Zugleich wurde mit der „Genomics Unit“ des Instituts für Molekularbiologie und Tumorforschung (IMT, Marburg) sowie dem LOEWE (Landes-Offensive zur Entwicklung Wissenschaftlich-ökonomischer Exzellenz)-Schwerpunkt „Tumor und Entzündung“, in Kooperation mit Herrn Dipl.-Biol. F. Finkernagel, eine zweifaktorielle Varianzanalyse (two-way ANOVA) durchgeführt. Aufgrund der experimentellen Fragestellung und dem Einfluss von zwei Faktoren (Genotyp und Infektion) auf die zu untersuchende Variable, wurde mit Hilfe der two-way ANOVA die Variabilität in ihre Komponenten (Status Genotyp und Status Infektion) zerlegt. Der bei diesem statistischen Analyseverfahren durchgeführte Test bezeichnet man als F-Test, der das Verhältnis zweier Varianzen darstellt bzw. die Varianz innerhalb einer Gruppe an der Varianz zwischen den Gruppen berechnet.

Für eine unabhängige statistische Analyse in der Kontingenztafel der histopathologischen Untersuchungen wurde, aufgrund geringer Anzahl von Individuen, der exakte Fisher-Test angewendet (<http://graphpad.com/quickcalcs/contingency1.cfm>).

In allen Analysen wurde ein Ergebnis mit einem p-Wert von $< 0,05$ als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der *Ali5*-Mäuse

Das durch Mutagenese erzeugte *Plcg2*^{*Ali5*} Mausmodell, mit einer *gain-of-function*-Mutation im *Plcg2*-Gen, trägt eine Überaktivierung von *Plcg2* und zeigt Symptome einer entzündlichen Autoimmunerkrankung, ähnlich dem systemischen Lupus Erythematoses (SLE) (Yu et al., 2005). Im Gegensatz zu den Nachkommen der ENU-behandelten C3H (C3HeB/FeJ) *Plcg2*^{*Ali5/+*} Mäuse entwickelten B6C3 *Plcg2*^{*Ali5/+*} Mäuse (Rückkreuzung C57BL/6 x C3HeB/FeJ) keine Entzündungen der Pfoten (Yu et al., 2005). Auch die in dieser Studie verwendeten BALB/c *Plcg2*^{*Ali5/+*} Mäuse wiesen phänotypisch keine Veränderungen auf und waren somit nicht von BALB/c WT Mäusen zu unterscheiden.

3.1.1 Genotypisierung

Die Genotypisierung der *Ali5*-Mäuse erfolgte mittels qualitativer PCR unter Verwendung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien sowie der beiden Primer *m.PLCg2-SL1.for* und *m.PLCg2-SR2.rev*. Über einen anschließenden Restriktionsverdau (*HincII*, Fermentas) des PCR-Produktes konnten alle drei Allelkombinationen (WT Mäuse, heterozygote *Plcg2*^{*Ali5/+*} Mäuse und homozygote *Plcg2*^{*Ali5/Ali5*} Mäuse) nach Auftrennung auf einem 1,5%igen Agarosegel bestimmt werden. Aufgrund der Punktmutation im *Plcg2*-Gen in Exon 27, bei der eine Purinbase gegen eine andere Purinbase (Adenin → Guanin) ausgetauscht ist, entfällt die *HincII* Restriktionsstelle (siehe Anhang, Abbildung 18). Die *HincII* Erkennungssequenz (5'-GT Py ↓ Pu AC-3' und 3'-CA Pu ↑ Py TG-5') kann nicht mehr identifiziert und die Restriktion nicht vollzogen werden. Homozygote *Plcg2*^{*Ali5/Ali5*} Mäuse weisen aus diesem Grund nur ein Fragment auf, wohingegen bei WT Mäusen zwei Fragmente (350 bp und 156 bp) im Agarosegel nachgewiesen werden können. Heterozygote *Plcg2*^{*Ali5/+*} Mäuse hingegen besitzen keine vollständige Transition der Purinbasen an der jeweiligen Stelle, so dass drei Fragmente zu sehen sind (506 bp, 350 bp und 156 bp) (Abbildung 7).

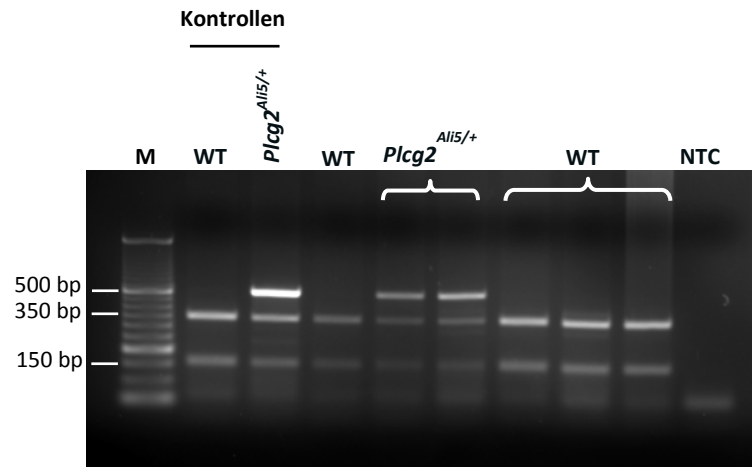


Abbildung 7: Genotypisierungs-PCR von *Ali5*-Mäusen.

Beispielhafte Genotypisierungs-PCR zur Darstellung der PCR-Produkte in einem 1,5%igem Agarosegel. Durch den Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus können Rückschlüsse auf den jeweiligen Genotyp gezogen werden. *Plcg2*^{*Ali5/+*} und WT Kontrollen wurden bei jeder PCR mitgeführt. NTC = no template control; M = 50 bp Molekulargewichtsmarker.

3.2 Einfluss der *Plcg2* gain-of-function-Mutation auf eine *H. felis*-induzierte gastrale MALT-Lymphom Entwicklung

PLCG2 ist ein Schlüsselmolekül für die Regulation des Immunsystems und B-Zellen (Hashimoto et al., 2000). Huynh et al. (2008) konnten zeigen, dass insbesondere das Gen der *PLCG2* in Patienten mit gastralem MALT-Lymphom, im Vergleich zur Gastritis desselben Patienten, hochreguliert ist. Aus diesem Grund wurde im Folgenden untersucht, ob eine gain-of-function-Mutation im *Plcg2*-Gen einen Effekt auf eine *H. felis*-induzierte MALT-Lymphom Entwicklung in heterozygoten *Plcg2*^{*Ali5/+*} und WT Mäusen hat.

3.2.1 Beweis einer *H. felis*-Infektion in den infizierten Mäusen

Eine positive *H. felis*-Infektion in den infizierten *Plcg2*^{*Ali5/+*} und WT Mäusen wurde *post-mortem* mittels qualitativer PCR überprüft. Dabei wurde die bakterielle, ribosomale 16S DNA (16S rDNA) im Magen der infizierten Mäuse nachgewiesen. Verwendet wurden hierbei Primer, die Groote et al. bereits 2001 für eine 16S rDNA basierte PCR beschrieb (De Groote et al., 2001).

Abbildung 8 stellt repräsentativ jeweils vier infizierte Mäuse jeden Genotyps der Mausgruppe 3 mit dem längsten Follow-up von 16 Monaten dar. Deutlich zu erkennen ist das 78 bp große *H. felis* Fragment, welches auf eine positive Infektion der Mäuse hinweist. Demgegenüber zeigten uninfizierte Kontrollmäuse, wie erwartet, kein *H. felis* 16S rDNA Fragment.

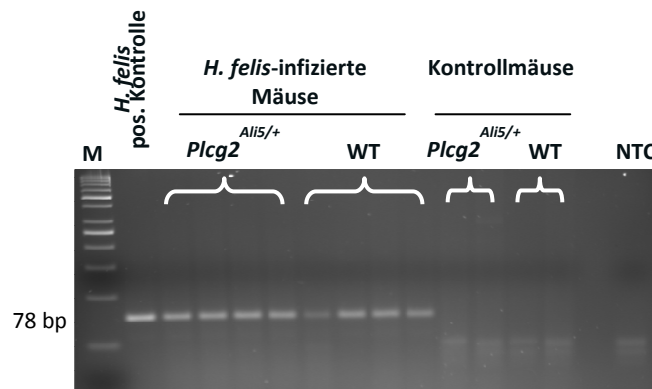


Abbildung 8: *Helicobacter felis*-Nachweis im Magen.

H. felis 16S rDNA basierte qualitative PCR: Ein 78 bp großes PCR-Fragment ist deutlich zu erkennen (3%iges Agarosegel) und weist auf eine positive Infektion der Mäuse hin. Die Kontrollmäuse (zwei von jedem Genotyp, repräsentativ dargestellt), weisen keine Bande auf. Verwendet wurde DNA aus FFPE-Gewebe (Magen). Eine reine *H. felis* DNA wurde bei jeder PCR als Positivkontrolle mitgeführt. NTC = no template control; M = 50 bp Molekulargewichtsmarker.

3.2.2 Bildgebende Diagnostik zur Beurteilung einer gastralen MALT-Lymphom Entwicklung

Patienten mit gastralen MALT-Lymphomen weisen erst im fortgeschrittenen Stadium eine Verschlechterung des Allgemeinzustandes auf. Zur Diagnostik wird neben der Endoskopie die Sonographie und radiologische Bildgebung durchgeführt. Im Mausmodell stellt allerdings die Magnetresonanztomographie (MRT) eine sinnvolle bildgebende Diagnostik dar, um den Verlauf der Krankheit in den *H. felis*-infizierten Mäusen zu beurteilen. Für diesen Versuch wurden alle drei Monate jeweils fünf Mäuse jeden Genotyps aus Gruppe 3 herangezogen, da diese aufgrund des langen Follow-up von 16 Monaten, zeitgemäß früher infiziert wurde. Somit war es möglich, die in dieser Gruppe gewonnenen Erfahrungen und Erkenntnisse bei Gruppe 1 (Follow-up von 6 Monaten) und Gruppe 2 (Follow-up von 12

Monaten) umzusetzen. Der Vorteil lag darin, dass wenige Tiere vor Ende des geplanten Tierversuchs verstarben und nicht für den Versuch ausgewertet werden konnten.

11 Monate nach *H. felis*-Infektion konnten bereits Anzeichen einer MALT-Lymphom Entwicklung beobachtet werden.

Abbildung 9A zeigt ein MRT einer BALB/c WT Maus mit einer deutlichen Verdickung der Magenmukosa und könnte auf die Entstehung eines MALT-Lymphoms hindeuten. Die *Plcg2*^{Ali5/+} Maus hingegen scheint 11 Monate nach Infektion, aufgrund der dünn zu scheinenden Magenwand, noch gesund zu sein (Abbildung 9B).

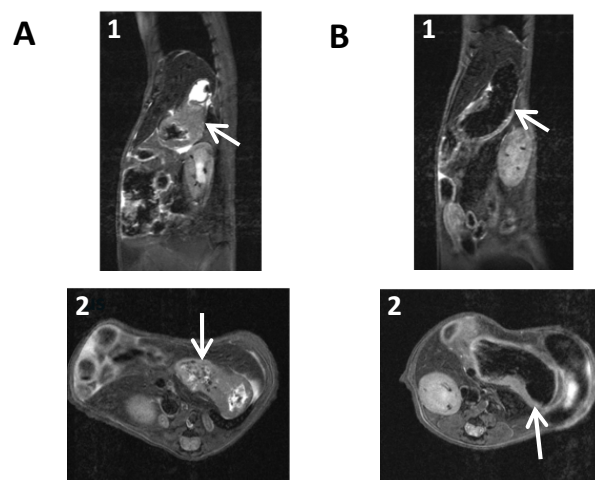


Abbildung 9: MRT des Abdomens von zwei *H. felis*-infizierten Mäusen.

(A) Eine BALB/c WT Maus zeigt eine deutliche Verdickung der Magenmukosa (11 Monate nach Infektion), wohingegen (B) eine *Plcg2*^{Ali5/+} Maus zum gleichen Zeitpunkt eine dünne Mukosa besitzt (weiße Pfeile). Die Untersuchungen fanden an einem 7 Teslar Kleintier Kernspintomographen (ClinScan 70/30 USR, Fa. Bruker) in Kooperation mit der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH (Standort Marburg) statt. Die Mäuse wurden mit 1-2%iger Isofluran-Inhalationsnarkose sediert. (1) Sagittalebene, (2) Transversalebene.

3.2.3 *H. felis*-infizierte *Plcg2*^{Ali5/+} Mäuse entwickeln seltener gastrale MALT-Lymphome

Infiziert wurden 3 Mausgruppen mit heterozygoten BALB/c *Plcg2*^{Ali5/+} sowie BALB/c WT Mäusen dreimal im Abstand von zwei Tagen mit *H. felis*. Nach unterschiedlich langen Beobachtungszeiten von 6, 12 und 16 Monaten wurden die Tiere getötet und auf die Entwicklung von MALT-Lymphomen untersucht. Isaacson beschrieb 1983 zwei klassische

Kriterien für die Bestimmung eines gastrointestinalen Lymphoms: Erstens die Infiltration der Schleimhaut, und somit Verdrängung der Drüsen durch maligne B-Lymphozyten (lymphoepitheliale Läsion), und zweitens deren Zerstörung (lymphoepitheliale Destruktion) (Isaacson and Wright, 1983b). Anhand dessen wurden die Befunde eingeteilt in: Normalbefund; chronische Gastritis mit lymphoiden Aggregaten und MALT-Lymphom (LEL, lymphoepitheliale Läsion und LED, lymphoepitheliale Destruktion).

Es wurden Stufenschnitte der Mägen angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (H&E), anti-B220 für B-Zellen und anti-Zytokeratin für Epithelzellen angefärbt (siehe Abbildung 10). Die Befundung der Mausmägen erfolgte verblindet durch Herrn Prof. Stolte aus dem Institut für Pathologie, Klinikum Kulmbach (Tabelle 13).

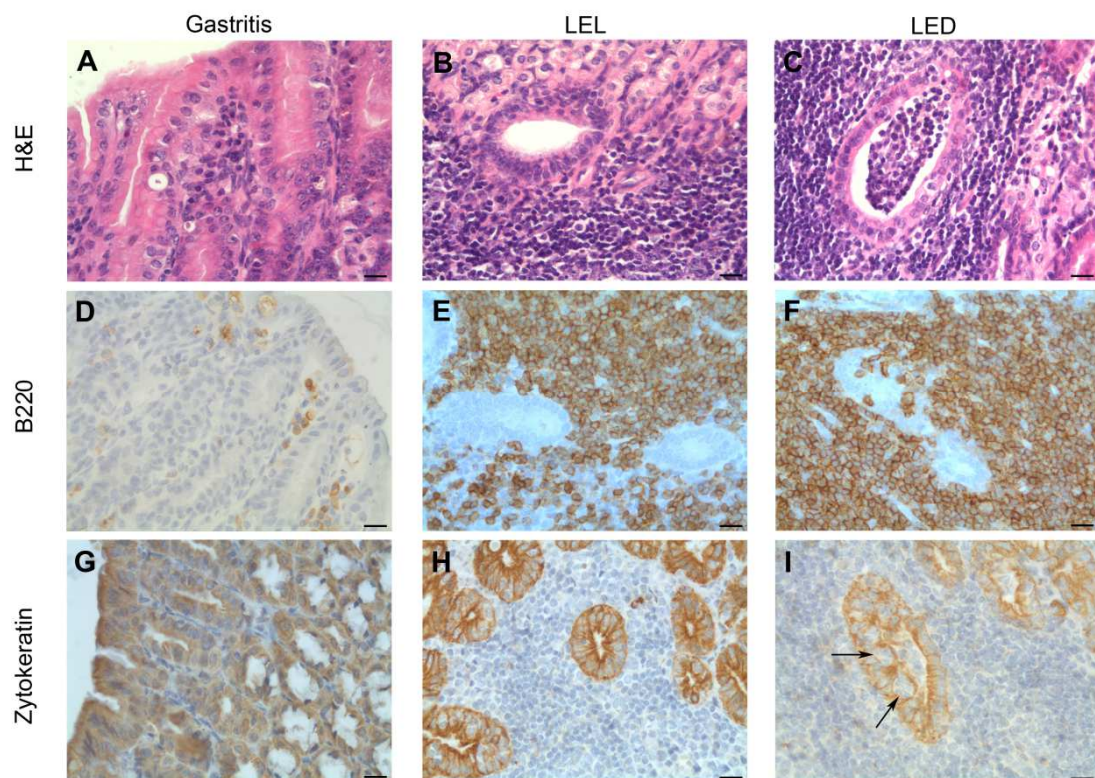


Abbildung 10: Histologie und Immunhistochemie gastraler MALT-Lymphom Entwicklung.

Repräsentative histologische und immunhistochemische Färbungen von chronischer Gastritis mit lymphoiden Aggregaten und MALT-Lymphomen mit lymphoepithelialen Läsionen (LEL) oder lymphoepithelialen Destruktionen (LED). (A-C) H&E Färbung, (D-F) B220 Färbung kennzeichnet B-Zellen und (G-I) anti-Zytokeratin färbt das Epithelium. Zentrozyten-ähnliche B-Zellen infiltrieren in das gastrale Drüsenepithel (Pfeile). Maßstabsleiste 20 µm und Vergrößerung x 40.

Tabelle 13: Histopathologische Befunde *H. felis*-infizierter *Plcg2^{Ali5/+}* und WT Mäuse.

BALB/c *Plcg2^{Ali5/+}* und WT Mäuse wurden an Tag 1, 3 und 5 mit *H. felis* infiziert und nach einem Beobachtungszeitraum von 6, 12 und 16 Monaten getötet. Normalbefund bezeichnet eine gesunde gastrale Mukosa.

Die statistische Auswertung erfolgte jeweils für ^{a, b, c} mit dem exakten Fisher-Test (Vergleich zwischen MALT-Lymphom Entwicklung und chronischer Gastritis mit lymphoiden Aggregaten) *Plcg2^{Ali5/+}* versus WT Mäuse $p = 1$, $p = 0,1431$, $p = 0,0142$.

^d Anzahl der Mäuse zu Beginn der Studie.

^e Anzahl der Mäuse, die innerhalb der Studie getötet oder gestorben sind (innerhalb der ersten 6 Monate nach Infektion).

Gruppe	Beobachtungszeit [Monate]	Genotyp	Anzahl der Mäuse		Normal- befund	lymphoide Aggregate	MALT- Lymphom
			einbezogen ^d	ausgeschieden ^e			
1 ^a	6	<i>Plcg2^{Ali5/+}</i>	11	1	40 % (4/10)	60 % (6/10)	0 %
		WT	11	0	46 % (5/11)	54 % (6/11)	0 %
2 ^b	12	<i>Plcg2^{Ali5/+}</i>	16	1	0 %	67 % (10/15)	33 % (5/15)
		WT	16	1	0 %	33 % (5/15)	67 % (10/15)
3 ^c	16	<i>Plcg2^{Ali5/+}</i>	17	3	0 %	50 % (7/14)	50 % (7/14)
		WT	17	2	0 %	7 % (1/15)	93 % (14/15)

Plcg2^{Ali5/+} und WT Mäuse der Gruppe 1 zeigten 6 Monate nach *H. felis*-Infektion keinen pathologischen Unterschied. 6 von 10 (60 %) *Plcg2^{Ali5/+}* Mäusen und 6 von 11 (54 %) WT Mäusen entwickelten eine chronische Gastritis mit lymphoiden Aggregaten. Gastrale MALT-Lymphome wurden zu diesem Zeitpunkt nicht entdeckt. Im Vergleich hierzu konnte bereits 12 Monate nach Infektion (Gruppe 2) ein Unterschied in der MALT-Lymphom Entwicklung beobachtet werden. Gastrale MALT-Lymphome wurden bei 5 von 15 (33 %) *Plcg2^{Ali5/+}* Mäusen und bei 10 von 15 (67 %) WT Mäusen entdeckt ($p = 0,1431$). *Plcg2^{Ali5/+}* Mäuse der 3. Gruppe, mit einem Follow-up von 16 Monaten, entwickelten signifikant weniger gastrale MALT-Lymphome im Vergleich zu den infizierten WT Mäusen derselben Gruppe. Nur 7 von 14 (50 %) *Plcg2^{Ali5/+}* Mäusen aber 14 von 15 (93 %) WT Mäusen erkrankten an einem MALT-

Lymphom ($p = 0,0142$) (siehe Tabelle 13). Mäuse, die innerhalb der ersten 6 Monate nach Infektion getötet wurden oder verstarben, wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen. Als Kontrolle dienten uninfizierte *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäuse, die, wie erwartet, weder MALT-Lymphome noch Gastritiden entwickelten (Tabelle 14).

Tabelle 14: Histopathologische Befunde uninfizierter Kontrollmäuse.

Normalbefund bezeichnet eine gesunde gastrale Mukosa.

^a Anzahl der Mäuse zu Beginn der Studie.

^b Anzahl der Mäuse die innerhalb der Studie getötet oder gestorben sind (innerhalb der ersten 6 Monate nach Infektion).

Kontrollmäuse	Genotyp	Anzahl der Mäuse		Normal- befund
		einbezogen ^a	ausgeschieden ^b	
uninfiziert	<i>Plcg2</i> ^{Ali5/+}	11	0	100 % (11/11)
	WT	11	1	100 % (10/10)

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass *H. felis*-infizierte *Plcg2*^{Ali5/+} Mäuse, im Vergleich zu infizierten WT Mäusen, signifikant weniger gastrale MALT-Lymphome entwickelten. Dieses Ergebnis stand im Gegensatz zu unserer ursprünglichen Arbeitshypothese. Dennoch fanden wir zwischen den Gruppen einen (unerwarteten) signifikanten Unterschied, und es galt herauszufinden, was die Gründe hierfür waren.

3.2.4 Untersuchung der *H. felis*-Kolonisationsrate in infizierten *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen

Eine mögliche Ursache für die geringere MALT-Lymphom Entwicklung in *H. felis*-infizierten *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen gegenüber infizierten WT Mäusen, mehrere Monate nach Infektion, könnte mit einem Unterschied in der bakteriellen Besiedlung und folglich mit einem differenten Persistenzverhalten von *H. felis* assoziiert sein. Aus diesem Grund wurde *post-mortem* die Kolonisationsrate von *H. felis*-infizierten *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen von Gruppe 2 und 3 (12 und 16 Monate nach Infektion) mittels quantitativer Real-time PCR untersucht. *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäuse der Gruppe 2 (Abbildung 11A) als auch die Mäuse beider

Genotypen aus Gruppe 3 (Abbildung 11B) zeigten eine vergleichbare bakterielle Besiedlung an *H. felis*.

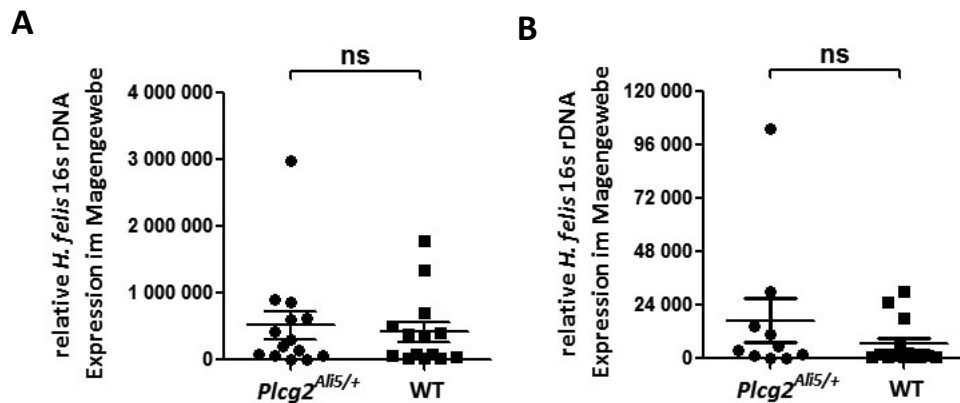


Abbildung 11: Bestimmung der *H. felis* Kolonisationsrate.

Plcg2^{Ali5/+} und WT Mäuse der **(A)** Gruppe 2 (12 Monate nach Infektion) und **(B)** Gruppe 3 (16 Monate nach Infektion) besaßen die gleiche *H. felis* Kolonisationsrate. Die bakterielle Besiedlung wurde mittels quantitativer PCR bestimmt. Jeder Punkt und jedes Quadrat repräsentiert die Messung eines Tieres (Gruppe 2: *Plcg2*^{Ali5/+} n = 14 und WT n = 14; Gruppe 3: *Plcg2*^{Ali5/+} n = 10 und WT n = 12). Die gezeigten Daten stellen zusätzlich den Mittelwert ± SEM dar. Ungepaarter t-Test. ns = nicht signifikant.

3.2.5 Steigerung der MALT-Lymphom Entwicklung nach *H. felis*-Reinfektion

Um die Auswirkung einer wiederholten *H. felis*-Infektion in beiden Genotypen zu untersuchen, wurden *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäuse in einem Dreimonatsintervall für insgesamt ein Jahr mit *H. felis* infiziert. Nach dieser Zeit wurden die Mäuse getötet, die Mägen histopathologisch aufgearbeitet und befundet (Tabelle 15). Es konnte gezeigt werden, dass eine Reinfektion durch *H. felis* nach einer Beobachtungszeit von 12 Monaten zu deutlich mehr MALT-Lymphomen in beiden Genotypen führte (83 % der *Plcg2*^{Ali5/+} und 100 % der WT Mäuse).

Tabelle 15: Histopathologische Befunde *H. felis*-reinfizierter *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäuse.

Plcg2^{Ali5/+} und WT Mäuse wurden in einem Abstand von drei Monaten, für insgesamt ein Jahr, reinfiziert. Normalbefund bezeichnet eine gesunde gastrale Mukosa.

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem exakten Fisher-Test (Vergleich zwischen MALT-Lymphom Entwicklung und chronischer Gastritis mit lymphoiden Aggregaten) *Plcg2*^{Ali5/+} versus WT Mäuse $p = 1$.

^a Anzahl der Mäuse zu Beginn der Studie.

^b Anzahl der Mäuse, die innerhalb des Infektionszeitraums starben. Eine histologische Befundung war aufgrund dessen nicht mehr möglich.

Gruppe	Reinfektion	Genotyp	Anzahl der Mäuse		Normal- befund	lymphoide Aggregate	MALT- Lymphom
			einbezogen ^a	ausgeschieden ^b			
4	viermal innerhalb 12 Monate	<i>Plcg2</i> ^{Ali5/+}	6	0	0 % (0/6)	17 % (1/6)	83 % (5/6)
		WT	6	3	0 % (0/3)	0 % (0/3)	100 % (3/3)

3.3 Herunterregulation proinflammatorischer Gene in *H. felis*-infizierten *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen

Um herauszufinden, ob die *gain-of-function*-Mutation im *Plcg2*-Gen Unterschiede im Expressionsprofil nach einer *H. felis*-Infektion hervorruft, wurden mit Hilfe eines PCR Arrays 91 verschiedene proinflammatorische Gene überprüft (siehe Anhang, Abbildung 17). Für das folgende Experiment wurde RNA aus peripherem Blut von infizierten *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen mit einem Follow-up von 6 Monaten herangezogen und wie in Kapitel 2.2.5.8 (Seite 57) eingesetzt. Uninfizierte Mäuse dienten dabei als Kontrolle. Die Expression der Gene wurde mit Hilfe der webbasierten Software (SABioscience/Qiagen GmbH) unter Benutzung des ungepaarten t-Tests ausgewertet.

Wie erwartet für ein Mausmodell mit einem Autoimmun-Phänotyp, zeigten nicht infizierte *Plcg2*^{Ali5/+} Mäuse, im Vergleich zu uninfizierten WT Mäusen, ein erhöhtes Expressionsprofil verschiedener proinflammatorischer Gene (Tabelle 16).

Tabelle 16: Regulation proinflammatorischer Gene infizierter und uninfizierter Mäuse.

Die Genexpression wurde mit Hilfe der von SABioscience/Qiagen GmbH entwickelten, webbasierten Software unter Verwendung des ungepaarten t-Tests ausgewertet. Als biologisch relevant wurden Gene mit einem p-Wert von $\leq 0,05$ und einer *Fold Regulation* von mindestens ± 2 betrachtet.

Uninfizierte Mäuse: n = 4 pro Genotyp; infizierte Mäuse: n = 7 pro Genotyp.

+, fold Hochregulation; -, fold Herunterregulation (Bsp.: Cebpb ist in uninfizierten $Plcg2^{Alis/+}$ Mäusen hochreguliert und Tnfrsf13c ist in uninfizierten $Plcg2^{Alis/+}$ Mäusen herunterreguliert).

Vergleich	Gen	Fold Regulation	p-Wert
Uninfiziert $Plcg2^{Alis/+}$ vs. uninfiziert WT	Cebpb	+2,187	0,0100
	Cxcl1	+2,851	0,0010
	Cxcr1	+3,997	0,0107
	Il-18	+5,613	0,0252
	S100a8	+2,614	0,0139
	Tlr2	+3,229	0,0024
	Tnfsf13	+3,742	0,0001
	Tnfrsf13c	-2,295	0,0140
	Tnfrsf17	-3,559	0,0209
Infiziert $Plcg2^{Alis/+}$ vs. infiziert WT	Ccl3	-2,841	0,0002
	Ccl4	-2,059	0,0037
	Ccl5	-2,331	0,0113
	Ccl20	-3,661	0,0292
	Cxcl1	-2,201	0,0153
	Ifng	-2,677	0,0421
	Il-1a	-2,898	0,0010
	Tnfrsf13c	-3,112	0,0052
Infiziert $Plcg2^{Alis/+}$ vs. uninfiziert $Plcg2^{Alis/+}$	Ccl3	-2,009	0,0498
	Ccl22	-2,372	0,0114
	Cxcl1	-2,187	0,0044
	Cxcl9	-2,175	0,0008
	Cxcl10	-2,069	0,0227
	Cxcr1	-2,326	0,0042
	Il-18	-5,676	0,0043
	Tlr2	-2,159	0,0005
	Tlr3	-2,059	0,0009
	Tnfsf13	-3,347	0,0003

Sechs Monate nach Infektion war erstaunlicherweise eine Herunterregulation von einer Reihe von Genen in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen, im Vergleich zu infizierten WT Mäusen, zu beobachten. Auch wichtige inflammatorische Marker, wie *Ifng* und *Il-1a*, waren nahezu um das Dreifache in infizierten *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen, im Vergleich zu infizierten WT Mäusen, herunterreguliert.

Innerhalb des *Ali5*-Genotyps konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu uninfizierten *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen eine Infektion mit *H. felis* wiederum zu einer Herunterregulation proinflammatorischer Gene, wie zum Beispiel die der Mitglieder der CXC-Familie *Cxcl1*, *Cxcl9* und *Cxcl10*, führt.

Im weiteren Verlauf wurde eine weitere statistische Auswertung herangezogen, um die PCR Array Ergebnisse nochmals unabhängig voneinander auszuwerten. Mit Hilfe der zweifaktoriellen Varianzanalyse (two-way ANOVA) können Genprofilunterschiede bestimmt werden, wodurch die o. g. Ergebnisse in Abhängigkeit vom Genotyp- oder Infektionsstatus untersucht werden konnten (Tabelle 17).

Tabelle 17: Proinflammatorisches Zytokinprofil von *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen (uninfiziert oder 6 Monate nach Infektion) eingeteilt in Genotyp- und Infektionsstatus.

Proinflammatorische Gene in peripherem Blut von infizierten und uninfizierten Mäusen wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (two-way ANOVA) ausgewertet. Als biologisch relevant wurden diejenigen hochregulierten (rot) und herunterregulierten (grün) Gene betrachtet, die einen p-Wert von $\leq 0,05$ und eine *Fold Regulation* von mindestens ± 2 hatten.

^a Genotypstatus, unabhängig von der *H. felis*-Infektion (*Plcg2*^{Ali5/+} versus WT Mäuse)

^b Infektionsstatus, unabhängig vom Genotypstatus (infiziert versus uninfizierte Mäuse)

Status	Gen	Regulation	p-Wert
Genotyp ^a	Ccl3	↓	0,0047
	Cd40	↓	0,0378
	Cxcr1	↑	0,0175
	S100a8	↑	0,0030
	Tlr2	↑	0,0100
	Tnfrsf13c	↓	0,0002
Infektion ^b	Cxcl5	↓	0,0119
	Tnfrsf13c	↓	0,0131

Dabei wurden nur Gene als biologisch relevant bestimmt, die einen p-Wert von $\leq 0,05$ und eine *Fold Regulation* von mindestens ± 2 aufwiesen. In Abhängigkeit vom Genotypstatus, und somit unabhängig von der *H. felis*-Infektion (*Plcg2*^{Ali5/+} versus WT Mäuse), waren *Ccl3* (*chemokine (c-c motif) ligand 3*), *Cd40* und *Tnfrsf13c* herunterreguliert, wohingegen *Cxcr1* (*chemokine (c-x-c motif) receptor 1*), *S100a8* und *Tlr2* (*toll-like receptor 2*) hochreguliert waren. Eine Infektion mit *H. felis* (infiziert versus uninfiziert), unabhängig vom Genotyp, führte hingegen zu einer Herunterregulation von *Cxcl5* und *Tnfrsf13c*.

Eine quantitative PCR wurde zur Bestätigung der PCR Array Ergebnisse durchgeführt und dabei zwei signifikant regulierte Gene des Genotyp- und Infektionsstatus (*Tnfrsf13c* und *S100a8*) überprüft. Für die Ermittlung der Primersequenzen wurden PCR-Produkte von *Tnfrsf13c* und *S100a8* verwendet. Nach Klonierung dieser PCR-Produkte in den pCR 2.1 TA Cloning Vektor (Invitrogen GmbH) folgte anschließend die Transformation, Plasmidpräparation und Sequenzierung. Die dadurch ermittelten Primersequenzen wurden schließlich für die Validierung des Arrays eingesetzt und die Ergebnisse aus Tabelle 17 konnten bestätigt werden. Tabelle 18 (siehe Anhang) zeigt nochmals den Vergleich der statistischen Auswertung der Array Daten und der quantitativen PCR aller validierten Gene.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine Vielzahl proinflammatorischer Gene in uninfizierten *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen hochreguliert war. Nach einer *H. felis*-Infektion zeigte sich jedoch eine Herunterregulation verschiedener proinflammatorischer Gene. Dies könnte begründen, warum die von Zytokinen abhängigen MALT-Lymphome seltener nach Infektion bei *Ali5*-Mäusen gefunden wurden.

3.3.1 Expressionslevel von IFN γ und IL-1 α im Langzeit-Follow-up

Mittels PCR-Array konnten wir zeigen, dass 6 Monate nach *H. felis*-Infektion u. a. zwei wichtige inflammatorische Zytokine, IFN γ und IL-1 α , in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen im Vergleich zu infizierten WT Mäusen herunterreguliert waren. Im nächsten Schritt sollte geklärt werden, ob auch bei einem Langzeit-Follow-up die Expression dieser zwei Gene durch die *H. felis*-Infektion im *Ali5*-Genotyp permanent herunterreguliert ist. Dazu wurde mittels quantitativer PCR die Expression von IFN γ und IL-1 α im peripherem Blut von *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen, 6, 12 und 16 Monate nach Infektion, analysiert (Abbildung 12). *Plcg2*^{Ali5/+}

Mäuse mit einem Follow-up von 6 Monaten zeigten im Vergleich zu WT Mäusen der gleichen Gruppe eine nahezu dreifache und signifikante Herunterregulation von IFN γ ($p = 0,003$). 12 Monate nach Infektion setzte sich das Ergebnis fort ($p = 0,0371$). Nach einem Langzeit-Follow-up von 16 Monaten zeigten *Plcg2*^{Ali5/+} Mäuse, verglichen mit WT Mäusen, keinen Unterschied in der IFN γ -Expression (Abbildung 12A).

IL-1a war hingegen nur in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen mit einer Beobachtungszeit von 6 Monaten signifikant herunterreguliert ($p = 0,008$) (Abbildung 12B). Nach einem Langzeit-Follow-up von 12 und 16 Monaten konnte kein Unterschied in der IL-1a-Expression zwischen *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen ermittelt werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Herunterregulation von IFN γ und IL-1a in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen bis zu 12 Monate nach Infektion vorliegt, sich der Expressionsunterschied über diese Zeit hinaus jedoch verliert.

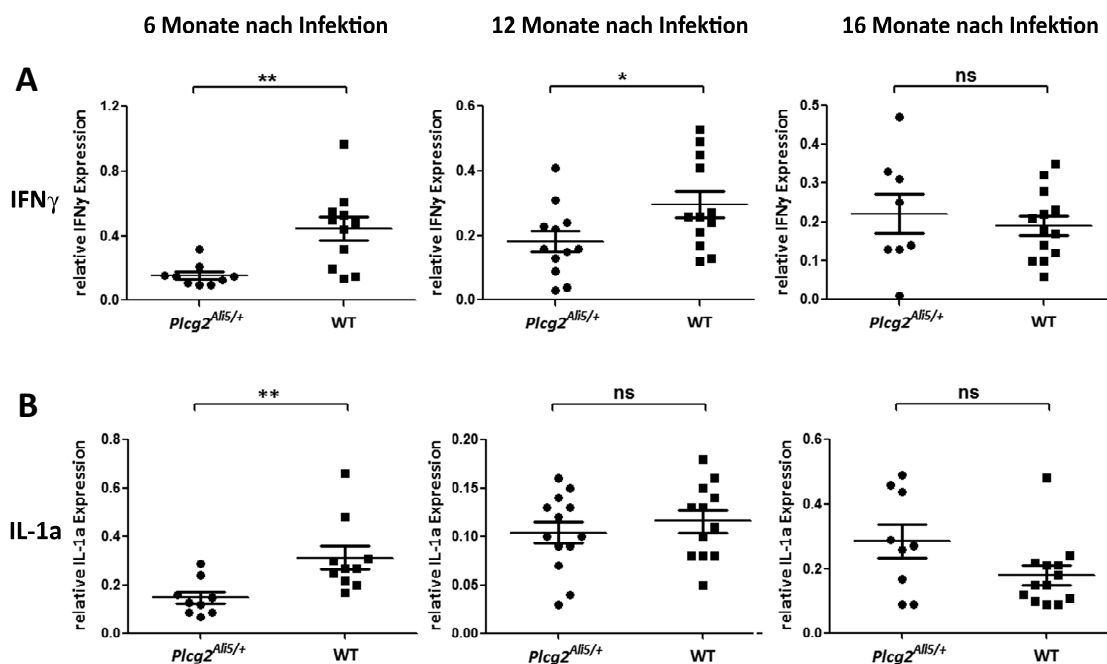


Abbildung 12: Herunterregulation von IFN γ und IL-1a in infizierten *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen.

Relative Genexpression von **(A)** IFN γ und **(B)** IL-1a in peripherem Blut von infizierten *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen, mit einem Follow-up von 6, 12 und 16 Monaten, wurde mittels quantitativer PCR bestimmt. Jeder Punkt und jedes Quadrat repräsentiert ein Tier (IFN γ qPCR: 6 Monate nach Infektion: $n = 9$ *Plcg2*^{Ali5/+} und $n = 11$ WT Mäuse; 12 Monate nach Infektion: $n = 12$ *Plcg2*^{Ali5/+} und $n = 12$ WT Mäuse; 16 Monate nach Infektion: $n = 8$ *Plcg2*^{Ali5/+} und $n = 13$ WT Mäuse; IL-1a qPCR: 6 Monate nach Infektion: $n = 9$ *Plcg2*^{Ali5/+} und $n = 10$ WT Mäuse; 12 Monate nach Infektion: $n = 13$ *Plcg2*^{Ali5/+} und $n = 12$ WT Mäuse; 16 Monate nach Infektion: $n = 9$ *Plcg2*^{Ali5/+} und $n = 13$ WT Mäuse). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Ungepaarter t-Test. ns = nicht signifikant. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

3.4 Untersuchung der B-Zell-Funktion in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen

Die oben aufgeführten Ergebnisse einer verminderten MALT-Lymphom Penetranz, vermutlich infolge einer reduzierten Zytokinantwort nach *H. felis*-Infektion in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen, waren unerwartet, da wir angenommen hatten, dass eine *gain-of-function*-Mutation in einem Protein (*Plcg2*), welches sowohl NF-κB als auch Ca²⁺-Einstrom und den Ras-Signalweg aktiviert, mehr Lymphome nach Antigenstimulation (i.e. *Helicobacter felis*) induzieren würde. Um einen möglicherweise vorherrschenden Defekt von B-Zellen in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen ausschließen zu können, wurde im ersten Schritt die Proliferationsfähigkeit dieser Zellpopulation untersucht (Abbildung 13). Angereicherte CD45R/B220⁺ B-Zellen von infizierten Tieren und uninfizierten Kontrollmäusen wurden *in vitro* mit unterschiedlichen Mitogenen für 48 Stunden stimuliert. Mit Hilfe des *BrdU Flow Kits* (BD Pharmingen) wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Alle in S-Phase befindlichen BrdU⁺-Zellen wurden auf ihre Proliferationsfähigkeit bestimmt. Abbildung 13A zeigt ein repräsentatives Beispiel der FACS-Analyse. Sowohl B-Zellen infizierter als auch uninfizierter Kontrollmäuse zeigten nach BCR-Stimulation keinen Unterschied der sich in S-Phase befindenden B-Zellen (Abbildung 13B und C). Ebenso war die Proliferation von *Plcg2*^{Ali5/+} und WT B-Zellen nach Mitogenstimulation nahezu identisch. Dieses Experiment ließ die Schlussfolgerung zu, dass die aktivierende Mutation im murinen *Plcg2*-Gen nicht in einem generellen Proliferationsdefekt von B-Zellen resultierte.

In einem weiteren Experiment sollten membranständige Antikörper aktivierter *Plcg2*^{Ali5/+} und WT B-Zellen uninfizierter Mäuse untersucht werden. Es ist bekannt, dass eine Aktivierung von B-Zellen mit LPS und IL-4 in einem Klassenwechsel von IgM zu IgG1 resultiert (Snapper et al., 1988). Im folgenden Versuch wurden angereicherte B-Zellen der Milz sowie Zellen von mesenterialen Lymphknoten (*mLN = mesenteric lymph nodes*) beider Genotypen für 4 Tage mit LPS und IL-4 stimuliert und die membranständige IgG1-Expression mittels FACS-Analyse nachgewiesen (Abbildung 14A). Eine Stimulation mit LPS allein diente dabei als Kontrolle. Wie erwartet zeigten B-Zellen uninfizierter *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäuse, nach alleiniger LPS Behandlung, keine erhöhte IgG1-Expression (Abbildung 14B und C). Nach dem LPS- und IL-4-vermittelten Klassenwechsel konnte gezeigt werden, dass die IgG1-Expression auf den B-Zellen beider Genotypen induzierbar ist [Mittelwert: *Plcg2*^{Ali5/+} - 13,61 % und WT - 11,74 % für B-Zellen der Milz; *Plcg2*^{Ali5/+} - 15,33 % und WT - 14,47 % für mLN B-Zellen] (Abbildung 14B und C).

Resümierend lässt sich sagen, dass *Plcg2*^{Ali5/+} und WT B-Zellen eine ähnliche B-Zell-Proliferation und IgG1-Expression aufweisen. Diese Daten sprechen gegen einen B-Zell-Defekt in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen als möglichen Grund einer reduzierten MALT-Lymphom Entwicklung.

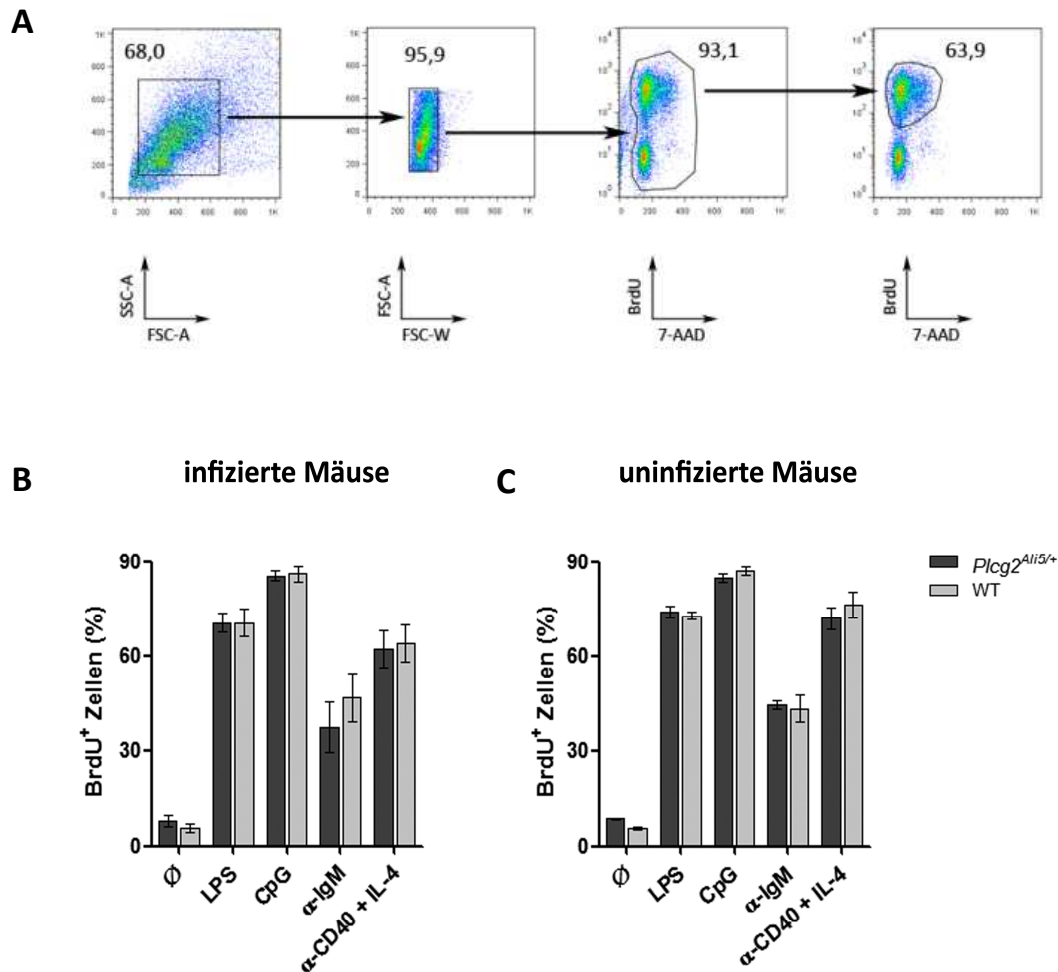


Abbildung 13: BrdU-Proliferationsassay von B-Zellen infizierter und uninfizierter Mäuse.

Angereicherte CD45R/B220⁺ B-Zellen der Milz wurden mit LPS (7,5 µg/ml), CpG (5 µg/ml), α-IgM (10 µg/ml) und α-CD40 (10 µg/ml) + IL-4 (10 ng/ml) stimuliert. Unstimulierte Zellen (Ø) wurden als Kontrollen mitgeführt. Nach einer vorangegangenen Inkubationszeit von 18 Stunden mit BrdU, wurde die Proliferation von primären B-Zellen der Milz 48 Stunden nach Stimulation mit Hilfe des *BrdU Flow Kits* (BD Pharmingen) gemessen. **(A)** Repräsentatives Beispiel einer FACS-Analyse von LPS stimulierten B-Zellen einer *Plcg2*^{Ali5/+} Maus. BrdU⁺ Zellen befinden sich in S-Phase und sind in Prozent angegeben. Stimulation primärer B-Zellen von **(B)** *H. felis*-infizierten Mäusen (12 Wochen nach Infektion) und **(C)** uninfizierten Mäusen zeigt keinen Unterschied in der Zellproliferation. Daten repräsentieren prozentualen Anteil lebender Zellen (nach Ausschluss apoptotischer Zellen) als Mittelwert ± SEM mit n = 6 infizierten Mäusen/Genotyp und n = 3 uninfizierten Mäusen/Genotyp. Ungepaarter t-Test.

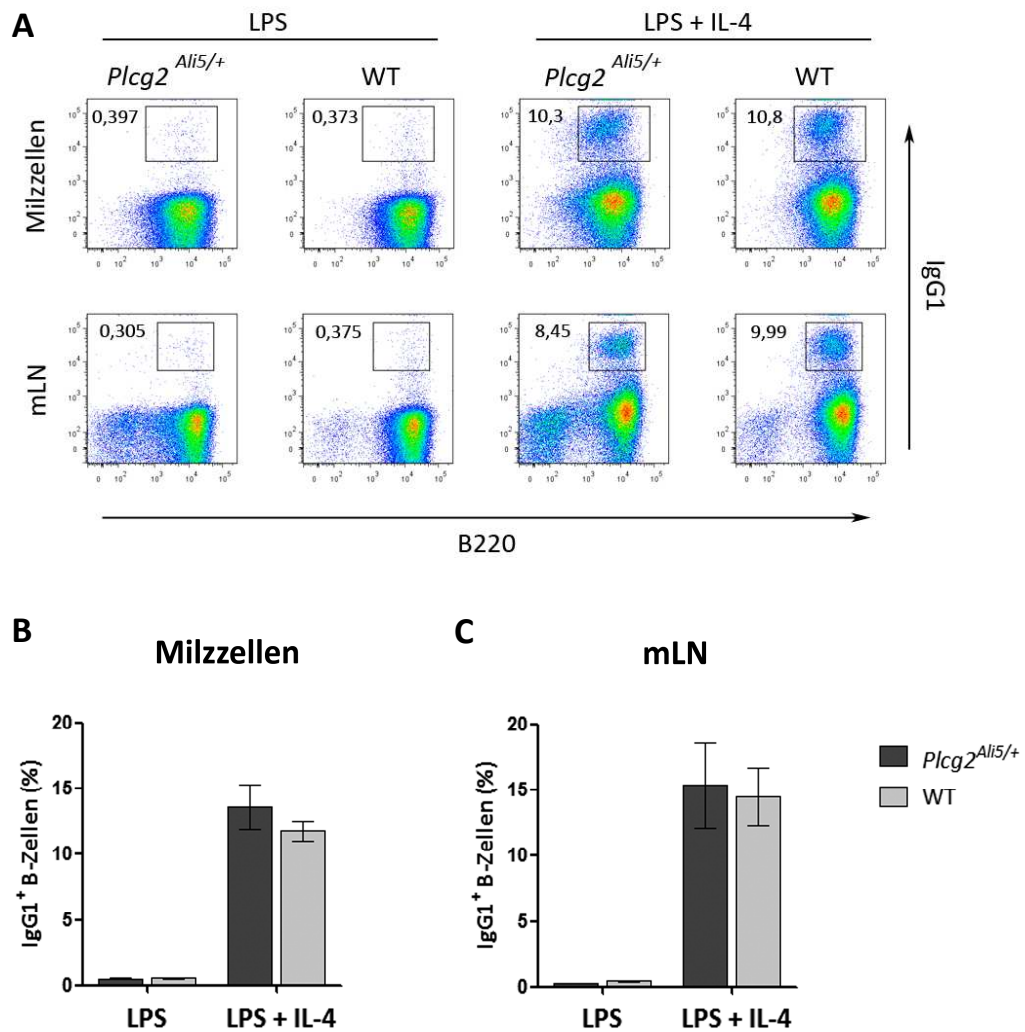


Abbildung 14: IgG1-Klassenwechsel von B-Zellen *in vitro*.

Angereicherte primäre CD43⁺ B-Zellen der Milz und primäre mLN-Zellen wurden mit LPS (20 µg/ml) sowie mit oder ohne IL-4 (500 U/ml) stimuliert. Die Zellen wurden vier Tage nach Stimulation mit α-IgG1 und α-CD45R/B220 gefärbt und die Ergebnisse mittels FACS-Analyse ausgewertet. **(A)** Repräsentatives Beispiel der membranständigen IgG1-Expression mittels FACS-Analyse von stimulierten *Plcg2^{Ali5/+}* und WT B-Zellen der Milz und mLNs in Prozentangabe. IgG1-Expression auf B-Zellen der **(B)** Milz und **(C)** mLNs uninfizierter *Plcg2^{Ali5/+}* und WT Mäuse. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM von zwei unabhängigen Experimenten mit n = 6 Mäusen pro Genotyp. Ungepaarter t-Test. mLN = *mesenteric lymph nodes*, mesenteriale Lymphknoten.

3.5 Verminderte *H. felis*-spezifische Antikörperantwort in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen

In den vorangegangenen *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass auch B-Zellen von *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen, in gleicher Weise wie WT B-Zellen, die Fähigkeit besitzen, sowohl durch Mitogenstimulation zu proliferieren als auch einen IgM zu IgG1 Antikörper-Klassenwechsel durchzuführen. Neben der Analyse des membrangebundenen IgG1 von *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen sollte nun mit Hilfe des folgenden *in vivo* Experiments die Gesamt- als auch antigenspezifischen Antikörpertiter im Serum von *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen ermittelt werden. Serum von infizierten Mäusen (12 Wochen nach Infektion) sowie von Kontrollmäusen wurde für die Messung der Antikörperlevel mittels ELISA herangezogen.

Im Vergleich zu den uninfizierten Kontrollmäusen kam es nach einer Infektion mit *H. felis* zu einer Erhöhung der IgG1- und IgG2a-Antikörpertiter im Serum beider Genotypen (Abbildung 15A und B).

Für die Messung *H. felis*-spezifischer IgG1- und IgG2a-Antikörpertiter wurde das Serum aller infizierten Mäuse gepoolt und als Standard verwendet. Wie erwartet, wurden in uninfizierten Mäusen keine antigenspezifischen Antikörper detektiert, womit eine Kreuzreaktion zu möglicherweise anderen *Helicobacter spp.* der Magenflora in diesen Untersuchungen ausgeschlossen ist. *H. felis*-spezifische IgG1- und IgG2a-Antikörper konnten in infizierten Mäusen beider Genotypen detektiert werden; ihr Level war allerdings in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen signifikant niedriger. *H. felis*-infizierte *Plcg2*^{Ali5/+} Mäuse zeigten einen 3,5-fach niedrigeren IgG1 ($p = 0,0307$) und 10-fach niedrigeren IgG2a-Titer ($p = 0,0016$) im Vergleich zu WT Mäusen (Abbildung 15C und D).

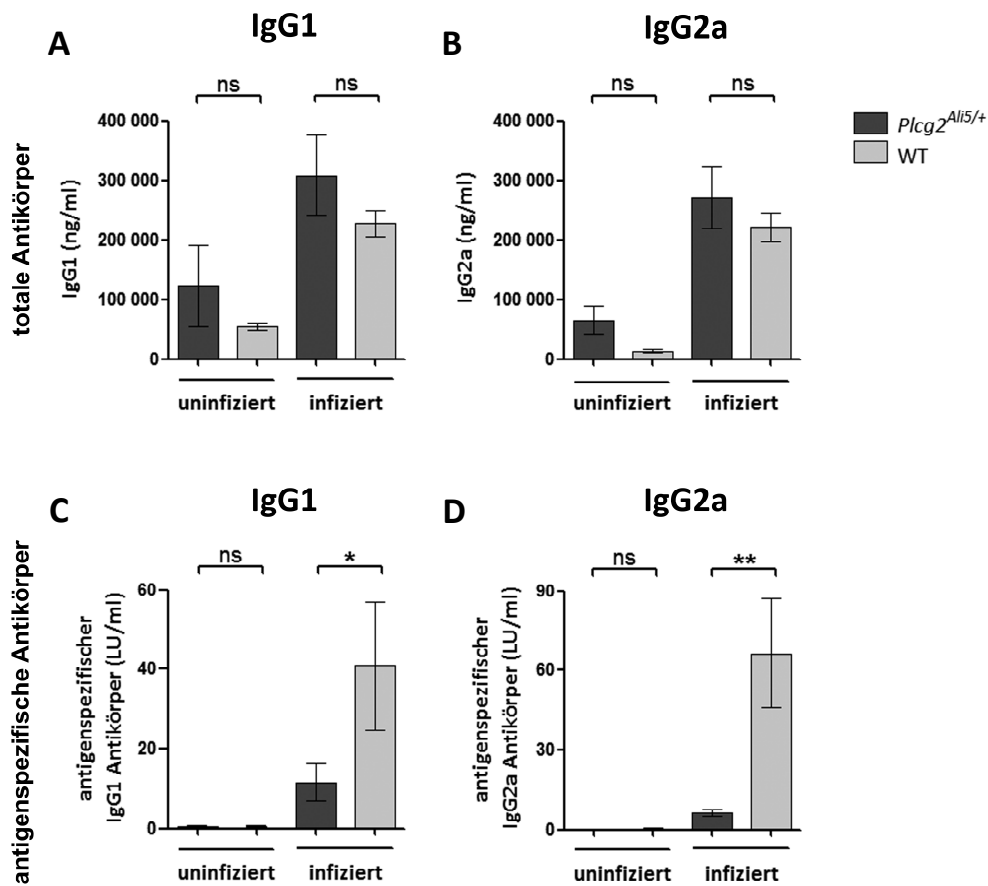


Abbildung 15: Totale und *H. felis*-spezifische Antikörpertiter infizierter und uninfizierter Mäuse.

Antikörpertiter im Serum von infizierten Mäusen (12 Wochen nach Infektion) sowie uninfizierten Mäusen wurde mittels ELISA ermittelt. (A und B) Infizierte *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäuse weisen im Vergleich zu uninfizierten Kontrollen erhöhte Gesamt-Antikörpertiter auf, wohingegen (C und D) in infizierten *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen verringerte antigenspezifische Antikörper detektiert wurden. Daten repräsentieren den Mittelwert ± SEM von drei unabhängigen Experimenten mit n = 14 infizierten *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen und n = 15 infizierten WT Mäusen. Zwei unabhängige Experimente wurden mit n = 4 uninfizierten Mäusen pro Genotyp durchgeführt. Mann-Whitney U-Test. LU = Labor Units; ns = nicht signifikant. **p* ≤ 0.05; ***p* ≤ 0.01.

3.6 Korrelation zwischen der Anzahl regulatorischer T-Zellen und der Entwicklung gastraler MALT-Lymphome

Verschiedene Publikationen zeigten bereits einen Zusammenhang zwischen regulatorischen T-Zellen und der Suppression einer *Helicobacter*-induzierten Inflammationsreaktion. Rad und Kollegen (2006) konnten zeigen, dass eine Depletion von Tregs zu einer erhöhten

gastralen Entzündungsreaktion in *Helicobacter*-infizierten Mäusen führt (Rad et al., 2006). Im Umkehrschluss könnte dies andeuten, dass eine höhere Anzahl von Tregs eine verminderte *H. felis*-spezifische Immunantwort sowie vielleicht sogar eine reduzierte Entwicklung von MALT-Lymphomen in *Plcg2^{Ali5/+}* Mäusen erklären könnte. Daher wurde hier die Anzahl von Foxp3⁺ Tregs in murinem Milzgewebe untersucht. Durch immunhistochemische CD3 und Foxp3 Färbungen der Milzen von uninfizierten *Plcg2^{Ali5/+}* und WT Mäusen wurde die Anzahl an Foxp3⁺ Tregs pro 1000 µm² (bezogen auf das CD3⁺ T-Zell Areal) bestimmt (siehe Anhang, Abbildung 19). Im Vergleich zu WT Mäusen zeigte sich eine signifikant höhere Anzahl von Tregs im Milzgewebe von *Plcg2^{Ali5/+}* Mäusen (p = 0,0109) (Abbildung 16A). Es fand sich also in der Tat eine Assoziation einer erhöhten Frequenz regulatorischer T-Zellen in *Plcg2^{Ali5/+}* Mäusen.

Die immunsuppressive Wirkung von Tregs kann u. a. infolge einer Umwandlung von proinflammatorischem Adenosintriphosphat (ATP) durch die beiden Ektoenzyme CD39 und CD73 in anti-inflammatorisches Adenosin erfolgen. Besondere Bedeutung wird hierbei der membrangebundenen Ekto-5'-Nukleotidase CD73 beigemessen. Alam und Kollegen (2009) konnten zeigen, dass CD73 exprimierende Tregs bei der Hemmung einer Inflamationsreaktion eine bedeutende Rolle spielen und eine *H. felis*-induzierte Gastritis in Mäusen unterdrücken (Alam et al., 2009). Gestützt auf diese Daten, wurde die Verteilung von CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ Tregs und insbesondere von CD73 exprimierenden Tregs in MNCs der Milz uninfizierter *Plcg2^{Ali5/+}* und WT Mäuse mittels Durchflusszytometrie analysiert. Abbildung 20 (siehe Anhang) stellt ein repräsentatives Beispiel einer prozentualen Verteilung von CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ Tregs und CD73⁺ Tregs dar. Auch in diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass *Plcg2^{Ali5/+}* Mäuse, im Vergleich zu den WT Mäusen, einen signifikant höheren Anteil an Tregs besitzen (Mittelwert: *Plcg2^{Ali5/+}* 9,13 % und WT 7,68 %, bezogen auf alle CD4⁺ Zellen) (p = 0,0125) (Abbildung 16B). Zusätzlich zeigten *Plcg2^{Ali5/+}* Mäuse eine höhere Expression von CD73⁺ Tregs (Mittelwert: 6,48 %, bezogen auf alle CD4⁺ Zellen) als WT Mäuse (Mittelwert: 5,16 %, bezogen auf alle CD4⁺ Zellen) (p = 0,0017) (Abbildung 16C).

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der oben zitierten Literatur und lassen darauf schließen, dass die höhere Rate an Tregs in *Plcg2^{Ali5/+}* Mäusen diese vor einer *H. felis*-induzierten MALT-Lymphom Entwicklung schützt.

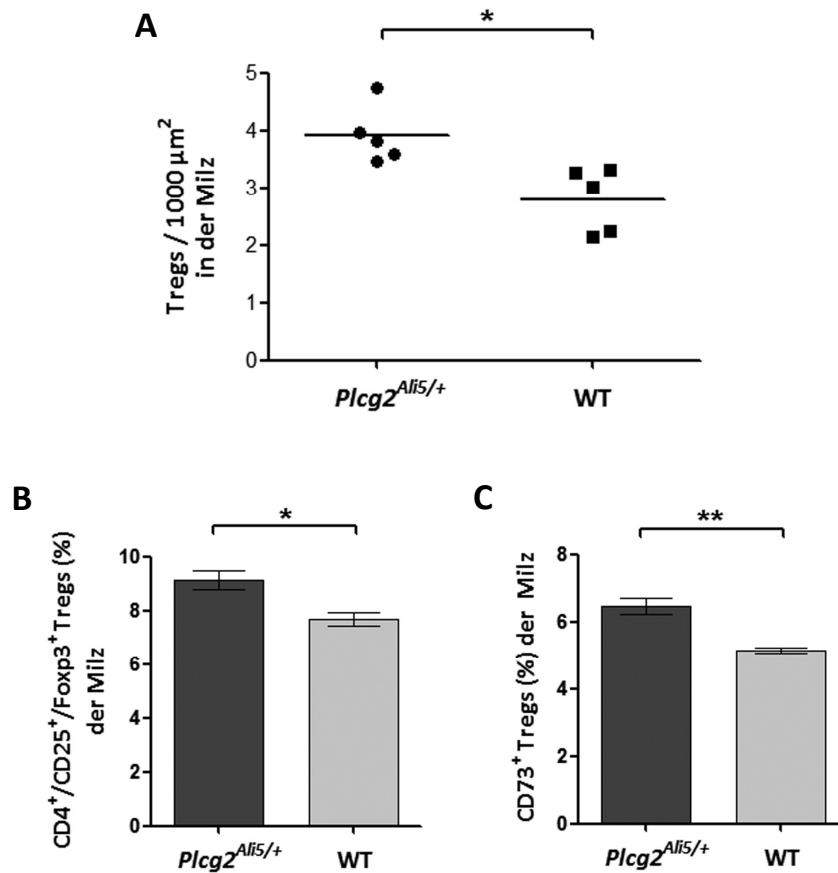


Abbildung 16: Erhöhte Foxp3⁺ Treg Zahl im Milzgewebe uninfizierter *Plcg2*^{Ali5/+} Mäuse.

(A) Histologisches Scoring von Foxp3⁺ Tregs in der Milz von uninfizierten Mäusen. Totale Anzahl von Foxp3⁺ Tregs in *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen (n = 5 pro Genotyp) wurde in den T-Zell Arealen der weißen Pulpa bestimmt und auf ein CD3⁺ T-Zell Areal von 1000 μm^2 bezogen. **(B-C)** Relativer Anteil von Tregs und Ecto-5'-nucleotidase (CD73) exprimierenden Tregs in CD4⁺ Milzzellen von *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen. MNCs der Milz wurden mit dem *Mouse Regulatory T-cell Staining Kit #2* und anti-CD73 gefärbt. Die Verteilung von CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ Tregs und CD73⁺ exprimierenden Tregs wurde mittels FACS-Analyse bestimmt und auf alle CD4⁺ T-Zellen bezogen. Prozentuale Verteilung von **(B)** CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ Tregs und **(C)** CD73⁺ exprimierenden Tregs in uninfizierten *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen. Dargestellt sind Daten von zwei bis drei unabhängigen Experimenten und n = 3 bis n = 4 Mäusen pro Genotyp. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; Ungepaarter t-Test; Tregs = regulatorische T-Zellen. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$.

4. Diskussion

Das gastrale MALT-Lymphom gehört zur Gruppe der B-Zell Non-Hodgkin-Lymphome, die eine maligne Erkrankung des lymphatischen Systems darstellen. Eine Reihe epidemiologischer und experimenteller Studien konnte eine enge Beziehung zwischen einer *Helicobacter*-Infektion und der Entwicklung von gastralen MALT-Lymphomen zeigen (Hussell et al., 1996; Hussell et al., 1993; Parsonnet et al., 1991; Stolte, 1992; Wotherspoon et al., 1991). Durch eine chronische Infektion mit *H. pylori* entsteht im Magen das Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe, aus dem nach langer Latenzzeit ein Mukosa-assoziiertes (i.e. MALT) Lymphom entstehen kann. Die Proliferation und klonale Expansion gastraler MALT-Lymphomzellen ist dabei von einer *Helicobacter*-spezifischen T-Zell-vermittelten Stimulation abhängig und zeigt somit die Korrelation zwischen einer chronischen Inflammation und der Lymphomgenese (Hussell et al., 1996; Hussell et al., 1993). Eine antibiotische *H. pylori*-Eradikationstherapie führt dabei zur Regression des indolenten MALT-Lymphoms im Stadium IE (Bayerdörffer et al., 1995; Du and Isaacson, 2002; Isaacson and Du, 2004; Neubauer et al., 1997; Stolte and Eidt, 1993; Wotherspoon et al., 1993; Wündisch et al., 2012; Wündisch et al., 2005).

Eine Reihe von Publikationen konnte zeigen, dass verschiedene Wirtsgen-Polymorphismen mit dem Verlauf eines *Helicobacter*-induzierten gastralen MALT-Lymphoms assoziiert sind (Cheng et al., 2006; Hellmig et al., 2004; Rollinson et al., 2003). Darüber hinaus fand unsere Arbeitsgruppe, dass das Gen *PLCG2* in diversen Lymphom-Entitäten des Menschen, u. a. in gastralen MALT-Lymphomen, überexprimiert ist (Huynh et al., 2015; Huynh et al., 2008; Marafioti et al., 2005). Die PLCγ2 stellt innerhalb des B-Zell-Rezeptor-vermittelten Signalwegs ein wichtiges Enzym dar, welches für die Regulation des Immunsystems und die Funktion physiologischer B-Zellen verantwortlich ist (Hashimoto et al., 2000; Suh et al., 2008).

Das *Ali5*-Mausmodell beschreibt einen durch Mutagenese erzeugten Mausstamm, der eine *gain-of-function*-Mutation im *Plcg2*-Gen aufweist. *Plcg2*^{*Ali5*} Mäuse zeigen Symptome einer inflammatorischen Autoimmunerkrankung, ähnlich dem systemischen Lupus Erythematodes (SLE) (Yu et al., 2005).

Basierend auf all den genannten Fakten und vor dem Hintergrund, dass auch *Helicobacter*-induzierte MALT-Lymphome autoimmunreaktive Autoantikörper exprimieren (Faller and Kirchner, 2000), sollte anhand des o. g. Mausmodells in dieser Arbeit der Einfluss einer

gain-of-function *Plcg2*-Mutation auf eine *Helicobacter*-induzierte MALT-Lymphom Entwicklung untersucht werden.

4.1 Die *gain-of-function*-Mutation des *Plcg2*-Gens schützt, entgegen der initialen Hypothese, vor der Entwicklung gastraler MALT Lymphome

Ein gut etabliertes Mausmodell für die Untersuchung *H. pylori*-induzierter Erkrankungen des Menschen stellt die Infektion von BALB/c Mäusen mit dem Maus-adaptierten *H. felis*-Stamm dar. Diese Mäuse entwickeln nach Langzeitinfektion gastrale MALT-Lymphome, die der humanen Lymphomerkkrankung ähneln (Enno et al., 1995; Lee et al., 1990; Müller et al., 2005; Müller et al., 2003).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Infektionsversuche wurden an heterozygoten BALB/c *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen vollzogen, die im Gegensatz zu homozygoten *Plcg2*^{Ali5/Ali5} Mäusen, phänotypisch keine entzündlichen Veränderungen aufweisen. Es konnte gezeigt werden, dass *H. felis*-infizierte *Plcg2*^{Ali5} Mäuse, im Vergleich zu infizierten WT Mäusen, signifikant weniger gastrale MALT-Lymphome entwickelten. Diese Daten sprechen gegen unsere initiale Hypothese, dass eine *gain-of-function*-Mutation im *Plcg2*-Gen unter einer *Helicobacter*-Infektion zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion und folglich zu einer früheren und höheren Inzidenz von MALT-Lymphomen führt. Basierend auf der Tatsache, dass es sich bei dem Enzym der *Plcg2* um einen wichtigen inflammatorischen Faktor handelt, der innerhalb der BCR-vermittelten Signalkaskade eng mit dem NF-κB Signalweg verknüpft ist (Niirö and Clark, 2002; Petro and Khan, 2001), wurde ursprünglich von einer Suszeptibilität dieser *Ali5*-Mäuse nach Aktivierung des B-Zell-Rezeptors für eine bakterielle Infektion ausgegangen.

Es ist bekannt, dass die Kolonisationsdichte der Magenschleimhaut mit *H. pylori* den Grad der inflammatorischen Antwort beeinflusst (Stolte et al., 1995). Zudem kann eine Eradikationstherapie des Keims zu einer Heilung von indolenten gastralen MALT-Lymphomen führen (Bayerdörffer et al., 1995; Neubauer et al., 1997; Stolte and Eidt, 1993; Wotherspoon et al., 1993; Wündisch et al., 2012). Aufgrund dieser Tatsachen könnte man vermuten, dass *Plcg2*^{Ali5} Mäuse, insbesondere im Hinblick auf das Vorliegen eines hyperaktiven Immunsystems, eine geringere bakterielle Besiedlung aufweisen, welche die

reduzierte MALT-Lymphom Entwicklung erklären könnte. Einen Unterschied in der Persistenz der *H. felis*-Infektion beider Genotypen konnten wir anhand einer quantitativen Real-time PCR allerdings ausschließen (siehe Kapitel 3.2.4).

Eine Reinfektion mit *H. felis* führte in beiden Genotypen zu einer höheren Inzidenz von MALT-Lymphomen. Die sich wiederholende Antigenstimulation verursacht, nach einem Follow-up von 12 Monaten, in annähernd jeder Maus, unabhängig vom Genotyp, ein gastrales MALT-Lymphom, wodurch gezeigt werden konnte, dass der protektive Effekt des *Plcg2*-Mutation in *Ali5*-Mäusen durch Reinfektion überwunden werden kann. Dieses Ergebnis unterstreicht nochmals deutlich, dass die Entwicklung gastraler MALT-Lymphome von einer chronischen Infektion mit *Helicobacter* abhängig ist.

In Übereinstimmung mit den Daten von P. Yu et al. (2005) für heterozygote *Plcg2*^{Ali5/+} Mäuse im C3H Hintergrund (Yu et al., 2005), zeigten auch BALB/c *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen ein erhöhtes proinflammatorischen Zytokinprofil im peripheren Blut. Vor allem TNFSF13 (*Tumor necrosis factor ligand superfamily member 13*), bekannt als APRIL (*a proliferating-inducing ligand*) und S100A8 (*S100 calcium binding protein a8* oder *Calgranulin A*) wurden bereits in Autoimmunerkrankungen, wie SLE, beschrieben und zeigten dort eine Überexpression (Chu et al., 2009; Yu et al., 2005).

Nach *H. felis*-Infektion zeigten *Plcg2*^{Ali5/+} Mäuse interessanterweise eine Herunterregulation verschiedenster proinflammatorischer Gene. *Helicobacter spp.* induzieren als Antigene eine lokale Inflamationsantwort der gastralen Mukosa, welche durch die Infiltration von Zellen des Immunsystems charakterisiert ist. So werden Neutrophile, B- und T-Zellen sowie Makrophagen durch verschiedene Mitglieder der CXC- und CC-Chemokin Unterfamilien an den Ort der Entzündung gelockt (Eck et al., 2000). Mehrere Gene dieser CXC- und CC-Chemokine waren im peripheren Blut von infizierten *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen herunterreguliert, u. a. das Gen für CCL20 (*chemokine (C-C motif) ligand 20*). In der Regel wird bei Entzündungen die Expression von CCL20 gesteigert (Fujiie et al., 2001). Bakterielle Faktoren wie LPS oder auch inflammatorische Zytokine wie IFN γ induzieren dabei die Expression von CCL20. Zudem tritt eine erhöhte Expression von CCL20 innerhalb einer humanen *H. pylori*-Infektion auf (Nishi et al., 2003; Yoshida et al., 2009).

In Bezug auf eine *Helicobacter*-Infektion-vermittelte T-Zell-Antwort existieren kontroverse Daten. Eine Infektion mit *H. pylori* im Menschen induziert die Infiltration von IFN γ produzierenden CD4⁺ Th1 T-Zellen in der gastralen Mukosa (Lohoff et al., 2000; Sommer et

al., 1998), wohingegen im Mausmodell der genetische Hintergrund sowie der *Helicobacter*-Stamm die T-Zell Antwort beeinflussen. So zeigen *H. felis*-infizierte BALB/c Mäuse eine prädominante Th2-Antwort (Enno et al., 1995; Müller et al., 2005).

In der vorliegenden Arbeit konnte dargestellt werden, dass infizierte *Plcg2*^{Ali5/+} Mäuse, im Vergleich zu infizierten WT Mäusen, eine Herunterregulation der Th1-Zytokine IFN γ und IL-1a aufwiesen. Zudem wurde gezeigt, dass verschiedene inflammatorische Gene innerhalb des *Ali5*-Genotyps (infiziert versus uninfiziert) herunterreguliert waren. Das legt die Vermutung nahe, dass die *Plcg2*-Mutation, in Verbindung mit einer *Helicobacter*-Infektion, für die reduzierte Expression proinflammatorischer Gene verantwortlich ist.

4.2 Geringere Suszeptibilität von *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen auf eine *H. felis*-induzierte gastrale MALT-Lymphom Entwicklung ist nicht das Ergebnis eines B-Zell-Defekts

Eine Studie von Ombrello et al. (2012) konnte zeigen, dass Patienten mit einer konstitutiven PLC γ 2 Aktivierung einen autoimmunen Phänotyp besitzen, der sich in Erkrankungen der Haut, einem Mangel an Antikörpern und einer Infektanfälligkeit äußert. Im Vergleich zu dem *Ali5*-Modell weisen diese Patienten eine Deletion der autoinhibitorischen Region des *PLCG2*-Gens auf. Eine mögliche Ursache für diesen beeinträchtigten Immunstatus könnte demnach eine persistierende Aktivierung des BCR-PLC γ 2 Signalwegs sein, der sich in einer B-Zell-Anergie äußert (Ombrello et al., 2012).

Aus diesem Grund wurden B-Zellen von *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen *in vitro* genauer analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass B-Zellen uninfizierter wie auch infizierter *Plcg2*^{Ali5/+} Mäuse in gleicher Weise in der Lage sind, nach Mitogenstimulation zu proliferieren wie WT B-Zellen. Dieses Ergebnis steht allerdings im Widerspruch zu den Daten von P. Yu et al. (2005), die zeigten, dass *Ali5*-Mäuse im C3H Hintergrund eine erhöhte B-Zell-Proliferation aufweisen (Yu et al., 2005). Mögliche Gründe für die divergenten Befunde zwischen C3H *Plcg2*^{Ali5/+} und BALB/c *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen könnten an den unterschiedlichen Mausstämmen oder differenten experimentellen Konditionen liegen.

In einem weiteren *in vitro* Experiment konnte gezeigt werden, dass *Plcg2*^{Ali5/+} B-Zellen der Milz und mesenterialen Lymphknoten, nach LPS- und IL-4-Stimulation, ähnlich wie WT B-

Zellen, membranständiges IgG1 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren können. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in uninfizierten als auch infizierten *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen, gegenüber WT Mäusen, eine Erhöhung des totalen Serum IgG1- und IgG2a-Antikörperlevels nachgewiesen werden konnte.

Basierend auf den genannten Daten denken wir, dass die inadäquate Immunantwort von *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen gegenüber einer *H. felis*-Infektion nicht die Folge eines B-Zell-Defekts ist.

4.3 Regulatorische T-Zellen in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen wirken protektiv auf die MALT-Lymphom Entwicklung

Regulatorische T-Zellen sind an der Kontrolle des Immunsystems beteiligt und spielen demzufolge eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immuntoleranz und -homöostase (Sakaguchi et al., 2009). Tregs haben die Aufgabe, eine zu starke Immunreaktion des Körpers zu unterdrücken. Sie wirken supprimierend auf Effektor-Funktionen von T-Zellen, B-Zellen, natürlichen Killerzellen sowie dendritischen Zellen und verhindern dadurch die Entstehung von Autoimmunkrankheiten (Braga et al., 2012; Mills, 2004; Raghavan and Quiding-Jarbrink, 2012; Wing and Sakaguchi, 2010).

Mehrere Publikationen beschreiben, dass es einen Zusammenhang zwischen einer *H. pylori*-Infektion und regulatorischen T-Zellen gibt (Craig et al., 2010; Jang, 2010; Kandulski et al., 2008; Lundgren et al., 2005; Lundgren et al., 2003; Raghavan and Quiding-Jarbrink, 2012). Eine Reihe von humanen wie auch murinen Studien konnte zeigen, dass die erhöhte Zahl an Tregs in der gastralen Mukosa mit einer reduzierten *Helicobacter*-induzierten Inflamationsreaktion einhergeht, die zugleich mit einer erhöhten bakteriellen Kolonisationsrate assoziiert ist (Kandulski et al., 2008; Lundgren et al., 2003; Rad et al., 2006; Raghavan et al., 2003; Raghavan and Holmgren, 2005). Die Arbeitsgruppe um Raghavan et al. konnte erstmalig im Jahr 2003 die Rolle von Tregs in der Immunantwort einer *H. pylori*-Infektion mittels Mausmodell genauer nachweisen. *H. pylori*-infizierte immundefiziente athymische Mäuse zeigten nach einem Transfer von T-Zellen, einschließlich immunregulatorischer Tregs, neben einer reduzierten Inflamationsreaktion auch eine höhere bakterielle Dichte (Raghavan et al., 2003). Eine weitere Studie von Rad et al. stellte ähnliche Ergebnisse dar. Die Depletion von Tregs durch die intraperitoneale Injektion eines anti-CD25 Mausantikörpers führte in *H. pylori*-infizierten C57BL/6 Mäusen

zur Depletion von Tregs und folglich zu einer starken Entzündungsreaktion, einer Erhöhung antigenspezifischer Antikörper und zu einer reduzierten bakteriellen Kolonisationsrate (Rad et al., 2006).

Eine unserer Hypothesen war, ob, *vice versa*, die verringerte inflammatorische Antwort in *Plcg2^{Ali5/+}* Mäusen womöglich mit einer erhöhten Anzahl an Tregs einhergeht. Tatsächlich konnte sowohl immunhistologisch als auch durchflusszytometrisch ein höherer Anteil $CD4^+/CD25^+/Foxp3^+$ Tregs in der Milz uninfizierter *Plcg2^{Ali5/+}* Mäuse, im Vergleich zu uninfizierten WT Mäusen, nachgewiesen werden. Eine erhöhte Persistenz des Keims, aufgrund der supprimierenden Wirkung von Tregs auf Effektor-T-Zellen (Belkaid and Rouse, 2005), konnte allerdings in *H. felis*-infizierten *Plcg2^{Ali5/+}* Mäusen nicht festgestellt werden. Dies könnte möglicherweise auf den genetischen Hintergrund des Mausstamms zurückzuführen sein. Eine vergleichsweise ähnliche Studie, wie die von Rad et al., führten Kaparakis und Kollegen an einem anderen Mausstamm durch. Sie konnten zeigen, dass eine CD25-Depletion keinen Einfluss auf die bakterielle Dichte sowie die gastrale Inflamationsreaktion in *Helicobacter*-infizierten BALB/c Mäusen hat, womit die genetische Komponente in der Treg-vermittelten Regulation von Entzündungsreaktionen eine Rolle zu spielen scheint. Dennoch konnte nach Treg-Depletion ein erhöhter Titer antigenspezifischer Antikörper nachgewiesen werden (Karakakis et al., 2006). Übereinstimmend mit den oben beschriebenen murinen Daten, wurde in *Plcg2^{Ali5/+}* Mäusen, mit einem erhöhten Anteil an Tregs, eine verringerte *H. felis*-spezifische IgG1- und IgG2a-Antikörperantwort detektiert. Tregs unterdrücken das Immunsystem, indem sie sowohl T-Zell-abhängig als auch T-Zell-unabhängig die B-Zell-Antikörperantwort inhibieren und direkt die Proliferation von B-Zellen supprimieren (Lim et al., 2005; Zhao et al., 2006). Die antigenspezifische T-Zell-vermittelte Immunantwort kann zum einen durch Zellkontakt-abhängige Mechanismen, z. B. durch PD-1 (engl.: *programmed death-1*) oder CTLA4, unterdrückt werden (Mills, 2004; von Boehmer, 2005); zum anderen können sie direkt über Perforin oder Granzym B zur Apoptose von Effektor-T-Zellen führen (Vignali et al., 2008; Xystrakis et al., 2006). Desweiteren können Tregs über die Sekretion anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-10 und TGF- β , ihre immunsuppressive Wirkung entfalten (Mills, 2004; Raghavan and Holmgren, 2005; von Boehmer, 2005).

IL-10-produzierende Tregs sind aktiv bei der Regulation einer *Helicobacter*-induzierten Gastritis beteiligt (Raghavan and Quiding-Jarbrink, 2012). So konnte in verschiedenen Mausmodellen gezeigt werden, dass IL-10 eine durchaus wichtige Rolle bei der

Unterdrückung einer *H. pylori*-induzierten gastralen Inflamationsreaktion spielt (Chen et al., 2001; Lee et al., 2007; Matsumoto et al., 2005). Eine *Helicobacter*-Infektion führt in der gastralen Mukosa und im peripheren Blut zu einer hohen Expression von IL-10 (Kandulski et al., 2008; Lundin et al., 2007; Roncarolo et al., 2006). Diese Kausalität kann in den Forschungsergebnissen dieser Arbeit allerdings nicht bestätigt werden. Nach *H. felis*-Infektion konnte im peripheren Blut kein Unterschied in der IL-10-Expression zwischen *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen detektiert werden. Somit scheinen Tregs in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen, möglicherweise unabhängig von IL-10, zu einer geringeren Inflamationsreaktion und einem reduzierten *H. felis*-induzierten Serum IgG1- und IgG2a-Antikörpertiter zu führen.

Wie bereits beschrieben, spielen Tregs bei der Prävention von Autoimmunkrankheiten eine entscheidende Rolle, da sie supprimierend auf Effektor-T-Zellantworten wirken bzw. die Aktivität von autoreaktiven T-Zellen kontrollieren (Braga et al., 2012; Mills, 2004; Sakaguchi et al., 2001). Anhand dieser Erkenntnisse lässt sich eine Diskrepanz zwischen dem in dieser Arbeit gezeigten Befund einer erhöhten Treg Rate in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen und dem autoimmunen *Ali5*-Mausmodell erkennen. Allerdings existieren eine Reihe gegensätzlicher Daten in Bezug auf die Inzidenz von Tregs in inflammatorischen Autoimmunkrankheiten. Zum einen konnte gezeigt werden, dass Patienten mit SLE eine niedrige Anzahl von Tregs aufweisen (Liu et al., 2004; Lyssuk et al., 2007), zum anderen konnten andere Arbeitsgruppen eine erhöhte Anzahl an Tregs in Autoimmun-Patienten mit rheumatoider Arthritis, SLE und Sjögren Syndrom nachweisen (Alvarado-Sanchez et al., 2006; Flores-Borja et al., 2008; Sarigul et al., 2010; Valencia and Lipsky, 2007; van Amelsfort et al., 2004; Yan et al., 2008). Yan et al. zeigten eine verringerte immunsupprimierende Funktion von Tregs in Patienten mit SLE aufgrund von IFN α -produzierenden Antigen-präsentierenden Zellen (APCs). In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass Tregs von SLE Patienten nicht per se dysfunktional sind. Sobald diese mit APCs aus gesunden Individuen co-kultiviert werden, lässt sich eine normale supprimierende Aktivität erkennen (Yan et al., 2008). Diese Publikationen unterstützen die Befunde in uninfizierten *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen bzgl. erhöhter Treg Anzahl und einem gesteigerten proinflammatorischen Zytokinprofil und könnten darauf hindeuten, dass durch die *H. felis*-Infektion die immunsuppressive Wirkung von Tregs in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen wiederhergestellt wird. Der exakte regulatorische Mechanismus bleibt jedoch ungeklärt.

Ein weiterer Mechanismus der Treg-vermittelten Immunsuppression ist die Umwandlung von proinflammatorischem Adenosintriphosphat (ATP) in entzündungshemmendes Adenosin. Die Akkumulation von ATP in die extrazelluläre Umgebung ist u. a. eine Antwort auf einen akuten und chronischen inflammatorischen Gewebeschaden bzw. zellulären Stress. Die Umwandlung in immunsuppressives Adenosin erfolgt über zwei, auf Tregs hochexprimierten, Ektoenzymen. Die Ektonukleotidase CD39 hydrolysiert ATP in Adenosinmonophosphat (AMP), wohingegen die Ekto-5'-Nukleotidase (CD73) AMP zu Adenosin generiert (Borsellino et al., 2007; Deaglio et al., 2007; Kumar and Sharma, 2009; Stagg and Smyth, 2010). Somit stellt CD73 einen überaus wichtigen und notwendigen Faktor bei der Produktion von extrazellulärem, anti-inflammatorischem Adenosin dar. Die immunsupprimierende Wirkung von Adenosin wird schließlich durch die Aktivierung von Adenosin-Rezeptoren auf T-Zellen, natürlichen Killerzellen und Makrophagen vermittelt (Beavis et al., 2012).

Mittels durchflusszytometrischer Analyse konnte die Expression CD73⁺ Tregs der Milz von *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen untersucht werden. Dabei stellte sich heraus, dass *Plcg2*^{Ali5/+} Mäuse tatsächlich nicht nur einen höheren Anteil an CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ Tregs im Milzgewebe haben, sondern auch eine höhere Anzahl CD73 exprimierender Tregs besitzen. Diese Ergebnisse sind vereinbar mit den Daten einer Studie von Alam et al., in der der Einfluss von CD73 während einer *Helicobacter*-Infektion in einem Mausmodell dargestellt wurde. Diese Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass CD73 exprimierende Tregs die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen sowie eine *H. felis*-induzierte Gastritis supprimieren (Alam et al., 2009).

Zusammenfassend wurde in der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Anzahl von Tregs in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen entdeckt, die möglicherweise beim Verlauf der *Helicobacter*-Langzeitinfektion eine entscheidende Rolle spielen. Trotz der Tatsache, dass *Plcg2* bei der Aktivierung von Immunzellen involviert ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die hier untersuchte *Plcg2*-Mutation, und die vermutlich daraus resultierende erhöhte Anzahl an immunsuppressiven CD73⁺ Tregs in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen, vor einer *Helicobacter*-induzierten MALT-Lymphom Entwicklung schützt.

4.4 Hypothese: Eine hohe Anzahl von Tregs hemmt die *Helicobacter*-induzierte chronische Inflammation und schützt in diesem Fall vor der Entwicklung des malignen Lymphoms

Anhand der *Helicobacter*-Langzeitinfektion von *Plcg2*^{Ali5/+} und WT Mäusen konnte gezeigt werden, dass die *Plcg2* *gain-of-function*-Mutation vor der Entwicklung eines malignen Lymphoms protektiv wirkt. Mögliche Gründe hierfür könnte die bereits vorhandene höhere Anzahl an immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen sein, die diese Mäuse vor einer *H. felis*-induzierten Entwicklung eines gastralen MALT-Lymphoms zu schützen scheint.

Tregs spielen bei der Regulierung des Gleichgewichts zwischen der Immunantwort des Wirts und der Persistenz der Infektion eine entscheidende Rolle (Kandulski et al., 2010; Raghavan and Holmgren, 2005). Zahlreiche Publikationen beschrieben, dass die Anzahl an Tregs in der gastralen Mukosa negativ mit dem Grad einer akuten *Helicobacter*-induzierten Entzündung korreliert (Kandulski et al., 2008; Lundgren et al., 2003; Rad et al., 2006; Raghavan et al., 2003; Raghavan and Holmgren, 2005). In einer Studie von Arnold et al. konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die neonatal mit *H. pylori* infiziert wurden, eine iTreg-vermittelte immunologische Toleranz gegenüber der Infektion entwickelten und somit vor der Entwicklung einer chronischen Gastritis und präneoplastischen Läsionen geschützt sind (Arnold et al., 2011). Dabei übt die frühe Infektion mit *H. pylori* einen direkten Einfluss auf dendritische Zellen aus, so dass diese zu tolerogenen dendritischen Zellen verändert werden und schließlich die Umwandlung naiver T-Zellen in iTregs induzieren (Oertli et al., 2012). In einer humanen Studie konnte gezeigt werden, dass die Entwicklung einer milden Gastritis in *H. pylori*-infizierten Kindern, im Gegensatz zu infizierten Erwachsenen, mit einer höheren Anzahl an Tregs und zugleich einem höheren Level von IL-10 und TGFβ1 in der gastralen Mukosa assoziiert ist (Harris et al., 2008).

Eine erhöhte Anzahl an Tregs hemmt die Effektor-T-Zell Antwort und korreliert mit einer erhöhten bakteriellen Kolonisationsrate (Rad et al., 2006; Raghavan et al., 2003). Die damit einhergehende Persistenz des Bakteriums und die Unfähigkeit des Immunsystems eine protektive inflammatorische Antwort aufzubauen führt wiederum zu einer chronischen Infektion und in einigen Fällen zur Entwicklung gastraler Tumore (Jang, 2010; Raghavan and Quiding-Jarbrink, 2012).

Kandulski et al. und Beswick et al. beschrieben bereits, dass möglicherweise eine höhere Anzahl von Tregs in der akuten Phase einer *Helicobacter*-Infektion protektiv wirkt, wohingegen sie zu einem späteren Zeitpunkt der chronischen Phase oder bei einem schon existierenden Tumor mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Beswick et al., 2011; Kandulski et al., 2010). Eine Akkumulation von Tregs in einem bereits etablierten Tumor führt somit zu einer Verschlechterung des Krankheitsbildes (Raghavan and Quiding-Jarbrink, 2012), da die Aktivität von zytotoxischen T-Zellen gehemmt wird (Wang et al., 2012).

Die bereits vor *H. felis*-Infektion erhöhte Anzahl an Tregs in der Milz von *Plcg2^{Ali5/+}* Mäusen spiegelt diesen Gedanken wider und könnte daher einen möglichen ersten Schutz vor *Helicobacter*-induzierten Krankheiten darstellen. Das geringere proinflammatorische Zytokinprofil, die schwache *H. felis*-spezifische Immunantwort sowie die reduzierte Entwicklung gastraler MALT-Lymphome in infizierten *Plcg2^{Ali5/+}* Mäusen sprechen für die o. g. Theorie.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Nach einer Infektion mit dem Magenkeim *H. pylori* scheitert oftmals das Immunsystem des Wirts daran, die Infektion, trotz antigenspezifischer Immunantwort, zu beseitigen. Grund dafür sind *Helicobacter*-spezifische Virulenzfaktoren, welche für die Langzeit-Persistenz des Keims verantwortlich sind (Israel and Peek, 2006). Keimspezifische Faktoren und die Immunantwort des Wirts haben Einfluss auf den Verlauf der Infektion. Eine Reihe von Publikationen beschreiben, dass verschiedene Wirtsgen-Polymorphismen, wie in den Genen für IL-1, CTLA4 und GST T1, mit einer gesteigerten Inflamationsreaktion und einer höheren Entstehungsrate von MALT-Lymphomen assoziiert sind (Cheng et al., 2006; Hellmig et al., 2004; Rollinson et al., 2003; Skibola et al., 2007). In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die in der *Ali5*-Maus vorhandene Mutation im *Plcg2*-Gen eine protektive Wirkung auf die MALT-Lymphom Entwicklung hat. Mit Hilfe von *in vitro* Versuchen konnte in *Plcg2^{Ali5/+}* Mäusen eine erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen der Milz nachgewiesen werden, die möglicherweise das Resultat der *Plcg2 gain-of-function*-Mutation sind. Die Akkumulation von Tregs scheint folglich für die geringere *H. felis*-

induzierte Inflammationsantwort und somit für die reduzierte gastrale MALT-Lymphom Entwicklung in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen verantwortlich zu sein.

Mit Hilfe weiterer *in vivo* Infektionsversuche könnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Akkumulation von Tregs in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen und dem daraus resultierenden Schutz vor einer gastralen MALT-Lymphom Entwicklung nachgewiesen werden. Die Depletion von Tregs in *H. felis*-infizierten *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen, mittels eines anti-CD25 Antikörpers, könnte darüber Aufschluss geben, ob diese, im Vergleich zu nicht behandelten *H. felis*-infizierten *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen, eine größere Neigung haben Lymphome zu entwickeln.

5. Zusammenfassung

Das Marginalzonen B-Zell-Lymphom vom MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*)-Typ des Magens ist eine Modellerkrankung für das Verständnis, wie eine bösartige Tumorerkrankung aus einer chronischen bakteriellen *Helicobacter pylori*-Infektion entstehen kann. Unsere Arbeitsgruppe war eine der Ersten die zeigen konnte, dass eine Eliminierung von *H. pylori* im frühen Stadium eines MALT-Lymphoms in vielen Fällen eine langanhaltende Remission bewirkt. Eine *H. pylori*-Eradikation stellt somit die Therapie erster Wahl im frühen Stadium eines gastralen MALT-Lymphoms dar.

Neben *Helicobacter*-spezifischen Virulenzfaktoren spielen spezifische Wirtsmerkmale bei der Entwicklung von MALT-Lymphomen eine ganz entscheidende Rolle. So führen verschiedene Wirtsgen-Polymorphismen, die für die Immunantwort und Entzündungsreaktion einer *H. pylori*-Infektion verantwortlich sind, zu einer gesteigerten inflammatorischen Antwort und zu einer stärkeren Neigung, gastrale MALT-Lymphome zu entwickeln. Zudem konnte unsere eigene Arbeitsgruppe zeigen, dass das Gen *Phospholipase C gamma 2* in gastralen MALT-Lymphomen, im Vergleich zur chronischen Entzündungsreaktion, überexprimiert ist.

Vor diesem Hintergrund untersucht die vorliegende Arbeit, inwieweit Mäuse, die aufgrund einer *gain-of-function*-Mutation im *Plcg2*-Gen Symptome einer gesteigerten Entzündungsreaktion und Autoimmunerkrankungen zeigen, eine frühere und höhere Inzidenz aufweisen, *H. felis*-induzierte MALT-Lymphome zu entwickeln. Eine *H. felis*-Infektion in Mäusen ruft dabei ganz ähnliche Symptome hervor wie eine humane *H. pylori*-Infektion. Entgegen der Erwartung konnte gezeigt werden, dass heterozygote *Plcg2*^{Ali5/+} Mäuse, im Vergleich zu WT Mäusen, signifikant weniger gastrale MALT-Lymphome entwickeln. Dies wurde von einer Herunterregulation proinflammatorischer Gene und einer verringerten *H. felis*-spezifischen Antikörperantwort in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen begleitet. Ein B-Zell-Defekt in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen konnte durch *in vitro* Experimente ausgeschlossen werden. Die Untersuchung regulatorischer T-Zellen im Milzgewebe beider Genotypen zeigte, dass *Plcg2*^{Ali5/+} Mäuse eine signifikant höhere Anzahl immunsuppressiver CD73 exprimierender Tregs besitzen. Anhand dieses Ergebnisses lässt sich die in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen verringerte Immunantwort gegenüber einer *Helicobacter*-Infektion erklären.

In dieser Arbeit konnte somit erstmals gezeigt werden, dass die *gain-of-function*-Mutation im *Plcg2*-Gen vor einer *Helicobacter*-induzierten MALT-Lymphom Entwicklung schützt. Die

Experimente und Auswertungen innerhalb dieser Arbeit lassen die Schlussfolgerung zu, dass die in *Plcg2*^{Ali5/+} Mäusen auftretende erhöhte Anzahl von Tregs möglicherweise für die geringere Entzündungsreaktion und folglich für die reduzierte Entstehung des Lymphoms verantwortlich ist.

6. Abstract

Gastric marginal zone B cell lymphoma of the MALT (*mucosa-associated lymphoid tissue*) type is a model disease to understand, how malignant tumors develop out of a chronic bacterial *H. pylori* infection. Our group was among the first to demonstrate that in most cases low-grade MALT lymphoma patients show long-term remission and cure after elimination of the *H. pylori* infection. Therefore, eradication of *H. pylori* is now always the first-line therapy for early stage gastric MALT lymphomas.

The interactions of *Helicobacter*-specific virulence factors and specific host characteristics play a crucial role in the development of MALT lymphomas. Various host gene polymorphisms, which are responsible for the immune response and inflammatory reactions of a *H. pylori* infection, are associated with an increased inflammatory response and consequently with a higher incidence of MALT lymphomas. In addition, our group has demonstrated that the gene for *phospholipase C gamma 2* is overexpressed in gastric MALT lymphoma as compared to chronic gastritis.

We therefore asked, whether autoimmune-prone mice with a *gain-of-function* mutation in the *Plcg2* gene are more susceptible to development of *H. felis*-induced gastric MALT lymphomas. Symptoms of a *H. felis* infection in mice are very similar to a human *H. pylori* infection. In contrast to our initial hypothesis, it could be shown that heterozygous *Plcg2*^{Ali5/+} mice developed significantly less gastric MALT lymphoma as compared to WT littermates. Infected *Plcg2*^{Ali5/+} mice showed downregulation of proinflammatory cytokines and decreased *H. felis*-specific antibody responses. An incisive B-cell defect in *Plcg2*^{Ali5/+} mice was ruled out by *in vitro* experiments. By examining regulatory T-cells in the spleen tissue of both genotypes we found out that *Plcg2*^{Ali5/+} mice have a significantly higher number of immunosuppressive CD73-expressing Tregs. This result could explain the decreased immune response of *Plcg2*^{Ali5/+} mice towards *H. felis* infection.

Altogether, these data demonstrate for the first time that the *gain-of-function* mutation in the *Plcg2* gene protects against *Helicobacter*-induced MALT lymphoma development. The experiments and analyses in this study allow to draw the conclusion that higher numbers of Tregs in *Plcg2*^{Ali5/+} mice may be responsible for the decreased inflammatory response and consequently for the reduced MALT lymphoma development.

7. Literaturverzeichnis

- Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 124:783-801.
- Alam, M.S., C.C. Kurtz, R.M. Rowlett, B.K. Reuter, E. Wiznerowicz, S. Das, J. Linden, S.E. Crowe, and P.B. Ernst. 2009. CD73 is expressed by human regulatory T helper cells and suppresses proinflammatory cytokine production and *Helicobacter felis*-induced gastritis in mice. *The Journal of infectious diseases*. 199:494-504.
- Alvarado-Sanchez, B., B. Hernandez-Castro, D. Portales-Perez, L. Baranda, E. Layseca-Espinosa, C. Abud-Mendoza, A.C. Cubillas-Tejeda, and R. Gonzalez-Amaro. 2006. Regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of autoimmunity*. 27:110-118.
- Amedei, A., M.P. Bergman, B.J. Appelmelk, A. Azzurri, M. Benagiano, C. Tamburini, R. van der Zee, J.L. Telford, C.M. Vandenbroucke-Grauls, M.M. D'Elis, and G. Del Prete. 2003. Molecular mimicry between *Helicobacter pylori* antigens and H⁺, K⁺ -- adenosine triphosphatase in human gastric autoimmunity. *The Journal of experimental medicine*. 198:1147-1156.
- Amedei, A., A. Cappon, G. Codolo, A. Cabrelle, A. Polenghi, M. Benagiano, E. Tasca, A. Azzurri, M.M. D'Elis, G. Del Prete, and M. de Bernard. 2006. The neutrophil-activating protein of *Helicobacter pylori* promotes Th1 immune responses. *The Journal of clinical investigation*. 116:1092-1101.
- Arnold, I.C., N. Dehzad, S. Reuter, H. Martin, B. Becher, C. Taube, and A. Muller. 2011. *Helicobacter pylori* infection prevents allergic asthma in mouse models through the induction of regulatory T cells. *The Journal of clinical investigation*. 121:3088-3093.
- Auer, I.A., R.D. Gascoyne, J.M. Connors, F.E. Cotter, T.C. Greiner, W.G. Sanger, and D.E. Horsman. 1997. t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 8:979-985.
- Backert, S., and W. Konig. 2005. Interplay of bacterial toxins with host defence: molecular mechanisms of immunomodulatory signalling. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 295:519-530.
- Basset, C., J. Holton, R. O'Mahony, and I. Roitt. 2003. Innate immunity and pathogen-host interaction. *Vaccine*. 21 Suppl 2:S12-23.
- Bauer, B., and T.F. Meyer. 2011. The Human Gastric Pathogen *Helicobacter pylori* and Its Association with Gastric Cancer and Ulcer Disease. *Ulcers*.
- Bayerdörffer, E., A. Neubauer, B. Rudolph, C. Thiede, N. Lehn, S. Eidt, and M. Stolte. 1995. Regression of primary lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after cure of *Helicobacter pylori* infection. *Lancet*. 345:1591-1594.
- Beavis, P.A., J. Stagg, P.K. Darcy, and M.J. Smyth. 2012. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends in immunology*. 33:231-237.
- Bel Hadj Jrad, B., A. Chatti, A. Laatiri, S.B. Ahmed, A. Romdhane, S. Ajimi, and L. Chouchane. 2007. Tumor necrosis factor promoter gene polymorphism associated with increased susceptibility to non-Hodgkin's lymphomas. *European journal of haematology*. 78:117-122.
- Belkaid, Y., C.A. Piccirillo, S. Mendez, E.M. Shevach, and D.L. Sacks. 2002. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 420:502-507.

- Belkaid, Y., and B.T. Rouse. 2005. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol.* 6:353-360.
- Bergman, M.P., and M.M. D'Elios. 2010. Cytotoxic T cells in H. pylori-related gastric autoimmunity and gastric lymphoma. *Journal of biomedicine & biotechnology.* 2010:104918.
- Beswick, E.J., I.V. Pinchuk, R.B. Earley, D.A. Schmitt, and V.E. Reyes. 2011. Role of gastric epithelial cell-derived transforming growth factor beta in reduced CD4+ T cell proliferation and development of regulatory T cells during Helicobacter pylori infection. *Infect Immun.* 79:2737-2745.
- Blaser, M.J., and J.C. Atherton. 2004. Helicobacter pylori persistence: biology and disease. *The Journal of clinical investigation.* 113:321-333.
- Blaser, M.J., and J. Parsonnet. 1994. Parasitism by the "slow" bacterium Helicobacter pylori leads to altered gastric homeostasis and neoplasia. *The Journal of clinical investigation.* 94:4-8.
- Borsellino, G., M. Kleinewietfeld, D. Di Mitri, A. Sternjak, A. Diamantini, R. Giometto, S. Hopner, D. Centonze, G. Bernardi, M.L. Dell'Acqua, P.M. Rossini, L. Battistini, O. Rotzschke, and K. Falk. 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 110:1225-1232.
- Braga, M., C. Schiavone, G. Di Gioacchino, I. De Angelis, E. Cavallucci, F. Lazzarin, C. Petrarca, and M. Di Gioacchino. 2012. Environment and T regulatory cells in allergy. *The Science of the total environment.* 423:193-201.
- Brandt, S., T. Kwok, R. Hartig, W. Konig, and S. Backert. 2005. NF-kappaB activation and potentiation of proinflammatory responses by the Helicobacter pylori CagA protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 102:9300-9305.
- Bunney, T.D., and M. Katan. 2011. PLC regulation: emerging pictures for molecular mechanisms. *Trends in biochemical sciences.* 36:88-96.
- Campo, E., S.H. Swerdlow, N.L. Harris, S. Pileri, H. Stein, and E.S. Jaffe. 2011. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood.* 117:5019-5032.
- Cavalli, F., P.G. Isaacson, R.D. Gascoyne, and E. Zucca. 2001. MALT Lymphomas. *Hematology.*
- Cerroni, L., N. Zochling, B. Putz, and H. Kerl. 1997. Infection by Borrelia burgdorferi and cutaneous B-cell lymphoma. *Journal of cutaneous pathology.* 24:457-461.
- Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K.J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, and S.M. Wahl. 2003. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of experimental medicine.* 198:1875-1886.
- Chen, W., D. Shu, and V.S. Chadwick. 2001. Helicobacter pylori infection: mechanism of colonization and functional dyspepsia Reduced colonization of gastric mucosa by Helicobacter pylori in mice deficient in interleukin-10. *Journal of gastroenterology and hepatology.* 16:377-383.
- Cheng, T.Y., J.T. Lin, L.T. Chen, C.T. Shun, H.P. Wang, M.T. Lin, T.E. Wang, A.L. Cheng, and M.S. Wu. 2006. Association of T-cell regulatory gene polymorphisms with susceptibility to gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 24:3483-3489.

- Chow, J.C., D.W. Young, D.T. Golenbock, W.J. Christ, and F. Gusovsky. 1999. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *The Journal of biological chemistry*. 274:10689-10692.
- Chu, V.T., P. Enghard, S. Schurer, G. Steinhauser, B. Rudolph, G. Riemekasten, and C. Berek. 2009. Systemic activation of the immune system induces aberrant BAFF and APRIL expression in B cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*. 60:2083-2093.
- Conteduca, V., D. Sansonno, G. Lauletta, S. Russi, G. Ingravallo, and F. Dammacco. 2013. H. pylori infection and gastric cancer: state of the art (review). *International journal of oncology*. 42:5-18.
- Craig, V.J., S.B. Cogliatti, I. Arnold, C. Gerke, J.E. Balandat, T. Wundisch, and A. Muller. 2010. B-cell receptor signaling and CD40 ligand-independent T cell help cooperate in Helicobacter-induced MALT lymphomagenesis. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 24:1186-1196.
- Curotto de Lafaille, M.A., and J.J. Lafaille. 2009. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 30:626-635.
- d'Amore, F., B.E. Christensen, H. Brincker, N.T. Pedersen, K. Thorling, J. Hastrup, M. Pedersen, M.K. Jensen, P. Johansen, E. Andersen, and et al. 1991. Clinicopathological features and prognostic factors in extranodal non-Hodgkin lymphomas. Danish LYFO Study Group. *Eur J Cancer*. 27:1201-1208.
- D'Elios, M.M., M.P. Bergman, A. Amedei, B.J. Appelmelk, and G. Del Prete. 2004. Helicobacter pylori and gastric autoimmunity. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 6:1395-1401.
- D'Elios, M.M., M. Manghetti, M. De Carli, F. Costa, C.T. Baldari, D. Burroni, J.L. Telford, S. Romagnani, and G. Del Prete. 1997. T helper 1 effector cells specific for Helicobacter pylori in the gastric antrum of patients with peptic ulcer disease. *J Immunol*. 158:962-967.
- De Bock, M., A. Decostere, K. Van den Bulck, M. Baele, L. Duchateau, F. Haesebrouck, and R. Ducatelle. 2005. The inflammatory response in the mouse stomach to Helicobacter bizzozeronii, Helicobacter salomonis and two Helicobacter felis Strains. *Journal of comparative pathology*. 133:83-91.
- De Groote, D., F. Haesebrouck, L.J. van Doorn, P. Vandamme, and R. Ducatelle. 2001. Evaluation of a group-specific 16S ribosomal DNA-based PCR for detection of Helicobacter bizzozeronii, Helicobacter felis, and Helicobacter salomonis in fresh and paraffin-embedded gastric biopsy specimens. *Journal of clinical microbiology*. 39:1197-1199.
- Deaglio, S., K.M. Dwyer, W. Gao, D. Friedman, A. Usheva, A. Erat, J.F. Chen, K. Enjoji, J. Linden, M. Oukka, V.K. Kuchroo, T.B. Strom, and S.C. Robson. 2007. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *The Journal of experimental medicine*. 204:1257-1265.
- Dierlamm, J., M. Baens, I. Wlodarska, M. Stefanova-Ouzounova, J.M. Hernandez, D.K. Hossfeld, C. De Wolf-Peeters, A. Hagemeijer, H. Van den Berghe, and P. Marynen. 1999. The apoptosis inhibitor gene API2 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood*. 93:3601-3609.
- Du, M.-Q., and P.G. Isaacson. 2002. Gastric MALT lymphoma: from aetiology to treatment. *The Lancet Oncology*. 3:97-104.
- Du, M., H. Peng, N. Singh, P.G. Isaacson, and L. Pan. 1995. The accumulation of p53 abnormalities is associated with progression of mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Blood*. 86:4587-4593.

- Eck, M., B. Schmausser, K. Scheller, A. Toksoy, M. Kraus, T. Menzel, H.K. Muller-Hermelink, and R. Gillitzer. 2000. CXC chemokines Gro(alpha)/IL-8 and IP-10/MIG in *Helicobacter pylori* gastritis. *Clinical and experimental immunology*. 122:192-199.
- Ellis, M.V., S.R. James, O. Perisic, C.P. Downes, R.L. Williams, and M. Katan. 1998. Catalytic domain of phosphoinositide-specific phospholipase C (PLC). Mutational analysis of residues within the active site and hydrophobic ridge of plcdelta1. *The Journal of biological chemistry*. 273:11650-11659.
- Enno, A., J. O'Rourke, S. Braye, R. Howlett, and A. Lee. 1998. Antigen-dependent progression of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT)-type lymphoma in the stomach. Effects of antimicrobial therapy on gastric MALT lymphoma in mice. *The American journal of pathology*. 152:1625-1632.
- Enno, A., J.L. O'Rourke, C.R. Howlett, A. Jack, M.F. Dixon, and A. Lee. 1995. MALToma-like lesions in the murine gastric mucosa after long-term infection with *Helicobacter felis*. A mouse model of *Helicobacter pylori*-induced gastric lymphoma. *Am J Pathol*. 147:217-222.
- Ernst, P.B., D.A. Peura, and S.E. Crowe. 2006. The translation of *Helicobacter pylori* basic research to patient care. *Gastroenterology*. 130:188-206; quiz 212-183.
- Faller, G., and T. Kirchner. 2000. Role of antigastric autoantibodies in chronic *Helicobacter pylori* infection. *Microscopy research and technique*. 48:321-326.
- Ferrero, R.L., P. Avé, F.J. Radcliff, A. Labigne, and M.R. Huerre. 2000. Outbred mice with long-term *Helicobacter felis* infection develop both gastric lymphoid tissue and glandular hyperplastic lesions. *J. Pathol*. 191:333-340.
- Fischbach, W. 2013. MALT lymphoma: forget surgery? *Dig Dis*. 31:38-42.
- Flores-Borja, F., E.C. Jury, C. Mauri, and M.R. Ehrenstein. 2008. Defects in CTLA-4 are associated with abnormal regulatory T cell function in rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:19396-19401.
- Freeman, C., J.W. Berg, and S.J. Cutler. 1972. Occurrence and prognosis of extranodal lymphomas. *Cancer*. 29:252-260.
- Frenck, R.W., Jr., and J. Clemens. 2003. *Helicobacter* in the developing world. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 5:705-713.
- Frydman, G.H., N. Davis, P.L. Beck, and J.G. Fox. 2015. *Helicobacter pylori* Eradication in Patients with Immune Thrombocytopenic Purpura: A Review and the Role of Biogeography. *Helicobacter*. 20:239-251.
- Fujiie, S., K. Hieshima, D. Izawa, T. Nakayama, R. Fujisawa, H. Ohyanagi, and O. Yoshie. 2001. Proinflammatory cytokines induce liver and activation-regulated chemokine/macrophage inflammatory protein-3alpha/CCL20 in mucosal epithelial cells through NF-kappaB [correction of NK-kappaB]. *International immunology*. 13:1255-1263.
- Gebert, B., W. Fischer, E. Weiss, R. Hoffmann, and R. Haas. 2003. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science*. 301:1099-1102.
- Greiner, A., C. Knorr, Y. Qin, W. Sebald, A. Schimpl, J. Banchereau, and H.K. Muller-Hermelink. 1997. Low-grade B cell lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue (MALT-type) require CD40-mediated signaling and Th2-type cytokines for in vitro growth and differentiation. *The American journal of pathology*. 150:1583-1593.
- Gresset, A., S.N. Hicks, T.K. Harden, and J. Sondek. 2010. Mechanism of phosphorylation-induced activation of phospholipase C-gamma isozymes. *The Journal of biological chemistry*. 285:35836-35847.

- Harris, N.L., E.S. Jaffe, H. Stein, P.M. Banks, J.K. Chan, M.L. Cleary, G. Delsol, C. De Wolf-Peeters, B. Falini, K.C. Gatter, and et al. 1994. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*. 84:1361-1392.
- Harris, P.R., S.W. Wright, C. Serrano, F. Riera, I. Duarte, J. Torres, A. Pena, A. Rollan, P. Viviani, E. Guiraldes, J.M. Schmitz, R.G. Lorenz, L. Novak, L.E. Smythies, and P.D. Smith. 2008. Helicobacter pylori gastritis in children is associated with a regulatory T-cell response. *Gastroenterology*. 134:491-499.
- Hashimoto, A., K. Takeda, M. Inaba, M. Sekimata, T. Kaisho, S. Ikehara, Y. Homma, S. Akira, and T. Kurosaki. 2000. Cutting edge: essential role of phospholipase C-gamma 2 in B cell development and function. *J Immunol*. 165:1738-1742.
- Hatakeyama, M. 2009. Helicobacter pylori and gastric carcinogenesis. *Journal of gastroenterology*. 44:239-248.
- Hellmig, S., S. Vollenberg, M.E. Goebeler-Kolve, W. Fischbach, J. Hampe, U.R. Folsch, and S. Schreiber. 2004. IL-1 gene cluster polymorphisms and development of primary gastric B-cell lymphoma in Helicobacter pylori infection. *Blood*. 104:2994-2995.
- Hicks, S.N., M.R. Jezyk, S. Gershburg, J.P. Seifert, T.K. Harden, and J. Sondek. 2008. General and versatile autoinhibition of PLC isozymes. *Molecular cell*. 31:383-394.
- Higashi, H., A. Nakaya, R. Tsutsumi, K. Yokoyama, Y. Fujii, S. Ishikawa, M. Higuchi, A. Takahashi, Y. Kurashima, Y. Teishikata, S. Tanaka, T. Azuma, and M. Hatakeyama. 2004. Helicobacter pylori CagA induces Ras-independent morphogenetic response through SHP-2 recruitment and activation. *The Journal of biological chemistry*. 279:17205-17216.
- Higashi, H., R. Tsutsumi, S. Muto, T. Sugiyama, T. Azuma, M. Asaka, and M. Hatakeyama. 2002. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of Helicobacter pylori CagA protein. *Science*. 295:683-686.
- Hikida, M., S. Johmura, A. Hashimoto, M. Takezaki, and T. Kurosaki. 2003. Coupling between B cell receptor and phospholipase C-gamma2 is essential for mature B cell development. *The Journal of experimental medicine*. 198:581-589.
- Hussell, T., P.G. Isaacson, J.E. Crabtree, and J. Spencer. 1996. Helicobacter pylori-specific tumour-infiltrating T cells provide contact dependent help for the growth of malignant B cells in low-grade gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. *J Pathol*. 178:122-127.
- Hussell, T., P.G. Isaacson, and J. Spencer. 1993. Proliferation and differentiation of tumour cells from B-cell lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue in vitro. *The Journal of pathology*. 169:221-227.
- Huynh, M.Q., J. Goßmann, W. Klapper, S. Gattenloehner, H.H. Wacker, A. Ramaswamy, A. Bittner, U. Kaiser, and A. Neubauer. 2015. Expression and pro-survival function of phospholipase C gamma 2 in diffuse large B cell lymphomas. *Leukemia & lymphoma*. 56:1088-1095.
- Huynh, M.Q., H.H. Wacker, T. Wundisch, K. Sohlbach, T.D. Kim, M. Krause, K. Stabla, P. Roth, W. Fischbach, M. Stolte, and A. Neubauer. 2008. Expression profiling reveals specific gene expression signatures in gastric MALT lymphomas. *Leukemia & lymphoma*. 49:974-983.
- Hyjek, E., and P.G. Isaacson. 1988. Primary B cell lymphoma of the thyroid and its relationship to Hashimoto's thyroiditis. *Human pathology*. 19:1315-1326.
- Hyjek, E., W.J. Smith, and P.G. Isaacson. 1988. Primary B-cell lymphoma of salivary glands and its relationship to myoepithelial sialadenitis. *Human pathology*. 19:766-776.
- IARC. 1994. Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC*

- monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer.* 61:1-241.
- Inagaki, H. 2007. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma: molecular pathogenesis and clinicopathological significance. *Pathology international*. 57:474-484.
- Isaacson, P., and D.H. Wright. 1983a. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer*. 52:1410-1416.
- Isaacson, P., and D.H. Wright. 1983b. Malignant lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue. A distinctive type of B-cell lymphoma. *Cancer*. 52:1410-1416.
- Isaacson, P., and D.H. Wright. 1984. Extranodal malignant lymphoma arising from mucosa-associated lymphoid tissue. *Cancer*. 53:2515-2524.
- Isaacson, P.G., and M.Q. Du. 2004. MALT lymphoma: from morphology to molecules. *Nature reviews. Cancer*. 4:644-653.
- Israel, D.A., and R.M. Peek, Jr. 2006. The role of persistence in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Current opinion in gastroenterology*. 22:3-7.
- Janeway, C.A., P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. 2001. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition. New York: Garland Pub.
- Jang, T.J. 2010. The number of Foxp3-positive regulatory T cells is increased in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *Pathology, research and practice*. 206:34-38.
- Jonuleit, H., and E. Schmitt. 2003. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol*. 171:6323-6327.
- Jonuleit, H., E. Schmitt, K. Steinbrink, and A.H. Enk. 2001. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends in immunology*. 22:394-400.
- Kandulski, A., P. Malfertheiner, and T. Wex. 2010. Role of regulatory T-cells in *H. pylori*-induced gastritis and gastric cancer. *Anticancer research*. 30:1093-1103.
- Kandulski, A., T. Wex, D. Kuester, U. Peitz, I. Gebert, A. Roessner, and P. Malfertheiner. 2008. Naturally occurring regulatory T cells (CD4+, CD25high, FOXP3+) in the antrum and cardia are associated with higher *H. pylori* colonization and increased gene expression of TGF-beta1. *Helicobacter*. 13:295-303.
- Kaparakis, M., K.L. Laurie, O. Wijburg, J. Pedersen, M. Pearce, I.R. van Driel, P.A. Gleeson, and R.A. Strugnell. 2006. CD4+ CD25+ regulatory T cells modulate the T-cell and antibody responses in *helicobacter*-infected BALB/c mice. *Infect Immun*. 74:3519-3529.
- Karin, M. 2009. NF-kB as a Critical Link Between Inflammation and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. .
- Karin, M., and F.R. Greten. 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews. Immunology*. 5:749-759.
- Katan, M. 1998. Families of phosphoinositide-specific phospholipase C: structure and function. *Biochim Biophys Acta*. . 1436:5-17.
- Katan, M., R. Rodriguez, M. Matsuda, Y.M. Newbatt, and G.W. Aherne. 2003. Structural and mechanistic aspects of phospholipase Cgamma regulation. *Advances in enzyme regulation*. 43:77-85.
- Krol, A.D., S. le Cessie, S. Snijder, J.C. Kluin-Nelemans, P.M. Kluin, and E.M. Noordijk. 2003. Primary extranodal non-Hodgkin's lymphoma (NHL): the impact of alternative definitions tested in the Comprehensive Cancer Centre West population-based NHL registry. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 14:131-139.
- Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira. 2011. Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*. 30:16-34.
- Kumar, V., and A. Sharma. 2009. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *European journal of pharmacology*. 616:7-15.

- Kwok, T., D. Zabler, S. Urman, M. Rohde, R. Hartig, S. Wessler, R. Misselwitz, J. Berger, N. Sewald, W. König, and S. Backert. 2007. Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation. *Nature*. 449:862-866.
- Lander, E.S., L.M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M.C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczy, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J.P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J.C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R.H. Waterston, R.K. Wilson, L.W. Hillier, J.D. McPherson, M.A. Marra, E.R. Mardis, L.A. Fulton, A.T. Chinwalla, K.H. Pepin, W.R. Gish, S.L. Chisoe, M.C. Wendl, K.D. Delehaunty, T.L. Miner, A. Delehaunty, J.B. Kramer, L.L. Cook, R.S. Fulton, D.L. Johnson, P.J. Minx, S.W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J.F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 409:860-921.
- Lee, A., J.G. Fox, G. Otto, and J. Murphy. 1990. A small animal model of human Helicobacter pylori active chronic gastritis. *Gastroenterology*. 99:1315-1323.
- Lee, A., S.L. Hazell, J. O'Rourke, and S. Kouprach. 1988. Isolation of a spiral-shaped bacterium from the cat stomach. *Infect Immun*. 56:2843-2850.
- Lee, A., J. O'Rourke, M.C. De Ungria, B. Robertson, G. Daskalopoulos, and M.F. Dixon. 1997. A standardized mouse model of Helicobacter pylori infection: introducing the Sydney strain. *Gastroenterology*. 112:1386-1397.
- Lee, C.W., V.P. Rao, A.B. Rogers, Z. Ge, S.E. Erdman, M.T. Whary, and J.G. Fox. 2007. Wild-type and interleukin-10-deficient regulatory T cells reduce effector T-cell-mediated gastroduodenitis in Rag2^{-/-} mice, but only wild-type regulatory T cells suppress Helicobacter pylori gastritis. *Infect Immun*. 75:2699-2707.
- Lee, S.K., A. Stack, E. Katzowitsch, S.I. Aizawa, S. Suerbaum, and C. Josenhans. 2003. Helicobacter pylori flagellins have very low intrinsic activity to stimulate human gastric epithelial cells via TLR5. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 5:1345-1356.
- Liang, S., P. Alard, Y. Zhao, S. Parnell, S.L. Clark, and M.M. Kosiewicz. 2005. Conversion of CD4⁺ CD25⁻ cells into CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus. *The Journal of experimental medicine*. 201:127-137.
- Lien, E., T.J. Sellati, A. Yoshimura, T.H. Flo, G. Rawadi, R.W. Finberg, J.D. Carroll, T. Espevik, R.R. Ingalls, J.D. Radolf, and D.T. Golenbock. 1999. Toll-like receptor 2 functions as a pattern recognition receptor for diverse bacterial products. *The Journal of biological chemistry*. 274:33419-33425.
- Lim, H.W., P. Hillsamer, A.H. Banham, and C.H. Kim. 2005. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol*. 175:4180-4183.
- Liu, M.F., C.R. Wang, L.L. Fung, and C.R. Wu. 2004. Decreased CD4⁺CD25⁺ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scandinavian journal of immunology*. 59:198-202.
- Lohoff, M., M. Rölinghoff, and F. Sommer. 2000. Helicobacter pylori gastritis: a Th1 mediated disease? *J Biotechnol*. 83:33-36.

- Lundgren, A., E. Stromberg, A. Sjoling, C. Lindholm, K. Enarsson, A. Edebo, E. Johnsson, E. Suri-Payer, P. Larsson, A. Rudin, A.M. Svennerholm, and B.S. Lundin. 2005. Mucosal FOXP3-expressing CD4⁺ CD25^{high} regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-infected patients. *Infect Immun.* 73:523-531.
- Lundgren, A., E. Suri-Payer, K. Enarsson, A.M. Svennerholm, and B.S. Lundin. 2003. *Helicobacter pylori*-Specific CD4⁺ CD25^{high} Regulatory T Cells Suppress Memory T-Cell Responses to *H. pylori* in Infected Individuals. *Infection and Immunity.* 71:1755-1762.
- Lundin, B.S., K. Enarsson, B. Kindlund, A. Lundgren, E. Johnsson, M. Quiding-Jarbrink, and A.M. Svennerholm. 2007. The local and systemic T-cell response to *Helicobacter pylori* in gastric cancer patients is characterised by production of interleukin-10. *Clin Immunol.* 125:205-213.
- Lyssuk, E.Y., A.V. Torgashina, S.K. Soloviev, E.L. Nasonov, and S.N. Bykovskaia. 2007. Reduced number and function of CD4⁺CD25^{high}FoxP3⁺ regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Advances in experimental medicine and biology.* 601:113-119.
- Mahnke, K., E. Schmitt, L. Bonifaz, A.H. Enk, and H. Jonuleit. 2002. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunology and cell biology.* 80:477-483.
- Malnick, S.D., E. Melzer, M. Attali, G. Duek, and J. Yahav. 2014. *Helicobacter pylori*: friend or foe? *World journal of gastroenterology : WJG.* 20:8979-8985.
- Marafioti, T., M. Pozzobon, M.L. Hansmann, G. Delsol, S.A. Pileri, and D.Y. Mason. 2004. Expression of intracellular signaling molecules in classical and lymphocyte predominance Hodgkin disease. *Blood.* 103:188-193.
- Marafioti, T., M. Pozzobon, M.L. Hansmann, P. Gaulard, T.F. Barth, C. Copie-Bergman, H. Roberton, R. Ventura, J.I. Martin-Subero, R.D. Gascoyne, S.A. Pileri, R. Siebert, E.D. Hsi, Y. Natkunam, P. Moller, and D.Y. Mason. 2005. Expression pattern of intracellular leukocyte-associated proteins in primary mediastinal B cell lymphoma. *Leukemia.* 19:856-861.
- Marshall, A.J., H. Niiro, T.J. Yun, and E.A. Clark. 2000. Regulation of B-cell activation and differentiation by the phosphatidylinositol 3-kinase and phospholipase Cgamma pathway. *Immunol Rev.* 176:30-46.
- Marshall, B.J., and J.R. Warren. 1984. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1:1311-1315.
- Matsumoto, Y., T.G. Blanchard, M.L. Drakes, M. Basu, R.W. Redline, A.D. Levine, and S.J. Czyn. 2005. Eradication of *Helicobacter pylori* and resolution of gastritis in the gastric mucosa of IL-10-deficient mice. *Helicobacter.* 10:407-415.
- McCoy, K.D., and G. Le Gros. 1999. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunology and cell biology.* 77:1-10.
- Megraud, F. 1995. Transmission of *Helicobacter pylori*: faecal-oral versus oral-oral route. *Alimentary pharmacology & therapeutics.* 9 Suppl 2:85-91.
- Miehlke, S., C. Kirsch, K. Agha-Amiri, T. Gunther, N. Lehn, P. Malfertheiner, M. Stolte, G. Ehninger, and E. Bayerdorffer. 2000. The *Helicobacter pylori* vacA s1, m1 genotype and cagA is associated with gastric carcinoma in Germany. *International journal of cancer. Journal international du cancer.* 87:322-327.
- Mills, K.H. 2004. Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nature reviews. Immunology.* 4:841-855.
- Mimuro, H., T. Suzuki, J. Tanaka, M. Asahi, R. Haas, and C. Sasakawa. 2002. Grb2 is a key mediator of *helicobacter pylori* CagA protein activities. *Molecular cell.* 10:745-755.

- Mogensen, T.H. 2009. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical microbiology reviews*. 22:240-273, Table of Contents.
- Mohammadi, M., R. Redline, J. Nedrud, and S. Czinn. 1996. Role of the host in pathogenesis of Helicobacter-associated gastritis: H. felis infection of inbred and congenic mouse strains. *Infect Immun*. 64:238-245.
- Montalban, C., A. Santon, C. Redondo, M. Garcia-Cosio, D. Boixeda, E. Vazquez-Sequeiros, F. Norman, C.M. de Argila, I. Alvarez, V. Abaira, and C. Bellas. 2005. Long-term persistence of molecular disease after histological remission in low-grade gastric MALT lymphoma treated with H. pylori eradication. Lack of association with translocation t(11;18): a 10-year updated follow-up of a prospective study. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 16:1539-1544.
- Morgner, A., E. Bayerdorffer, A. Neubauer, and M. Stolte. 2001. Helicobacter pylori associated gastric B cell MALT lymphoma: predictive factors for regression. *Gut*. 48:290-292.
- Morgner, A., E. Bayerdorffer, A. Neubauer, and M. Stolte. 2000. Gastric MALT Lymphoma and Its Relationship to Helicobacter pylori Infection: Management and Pathogenesis of the Disease. *Microsc Res Tech*. 48:349-356.
- Müller, A., J. O'Rourke, P. Chu, A. Chu, M.F. Dixon, D.M. Bouley, A. Lee, and S. Falkow. 2005. The Role of Antigenic Drive and Tumor-Infiltrating Accessory Cells in the Pathogenesis of Helicobacter-Induced Mucosa-Associated Lymphoid Tissue Lymphoma. *The American journal of pathology*. 167:797-812.
- Müller, A., J. O'Rourke, J. Grimm, K. Guillemin, M.F. Dixon, A. Lee, and S. Falkow. 2003. Distinct gene expression profiles characterize the histopathological stages of disease in Helicobacter-induced mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:1292-1297.
- Muotiala, A., I.M. Helander, L. Pyhala, T.U. Kosunen, and A.P. Moran. 1992. Low biological activity of Helicobacter pylori lipopolysaccharide. *Infect Immun*. 60:1714-1716.
- Musshoff, K. 1977. Klinische Stadieneinteilung der Nicht-Hodgkin-Lymphome. *Strahlentherapie*. 153:218-221.
- Mutters, R., C. Nonnenmacher, C. Susin, U. Albrecht, R. Kropatsch, and S. Schumacher. 2009. Quantitative detection of Clostridium difficile in hospital environmental samples by real-time polymerase chain reaction. *The Journal of hospital infection*. 71:43-48.
- Nedrud, J.G. 1999. Animal models for gastric Helicobacter immunology and vaccine studies. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 24:243-250.
- Neubauer, A., C. Thiede, A. Morgner, B. Alpen, M. Ritter, B. Neubauer, T. Wündisch, G. Ehninger, M. Stolte, and E. Bayerdorffer. 1997. Cure of Helicobacter pylori infection and duration of remission of low-grade gastric MALT lymphoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 89:1350-1355.
- Newton, R., J. Ferlay, V. Beral, and S.S. Devesa. 1997. The epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma: comparison of nodal and extra-nodal sites. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 72:923-930.
- Nielsen, C.H., and R.G.Q. Leslie. 2005. Regulation of B-Cell Activation by Complement Receptors and Fc Receptors. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 32:339-347.
- Niemann, C.U., and A. Wiestner. 2013. B-cell receptor signaling as a driver of lymphoma development and evolution. *Seminars in cancer biology*. 23:410-421.
- Niiri, H., and E.A. Clark. 2002. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nature reviews. Immunology*. 2:945-956.

- Nishi, T., K. Okazaki, K. Kawasaki, T. Fukui, H. Tamaki, M. Matsuura, M. Asada, T. Watanabe, K. Uchida, N. Watanabe, H. Nakase, M. Ohana, H. Hiai, and T. Chiba. 2003. Involvement of myeloid dendritic cells in the development of gastric secondary lymphoid follicles in *Helicobacter pylori*-infected neonatally thymectomized BALB/c mice. *Infect Immun.* 71:2153-2162.
- Nurgalieva, Z.Z., M.E. Conner, A.R. Opekun, C.Q. Zheng, S.N. Elliott, P.B. Ernst, M. Osato, M.K. Estes, and D.Y. Graham. 2005. B-cell and T-cell immune responses to experimental *Helicobacter pylori* infection in humans. *Infect Immun.* 73:2999-3006.
- Oertli, M., M. Sundquist, I. Hitzler, D.B. Engler, I.C. Arnold, S. Reuter, J. Maxeiner, M. Hansson, C. Taube, M. Quiding-Jarbrink, and A. Müller. 2012. DC-derived IL-18 drives Treg differentiation, murine *Helicobacter pylori*-specific immune tolerance, and asthma protection. *The Journal of clinical investigation.* 122:1082-1096.
- Ohkura, N., Y. Kitagawa, and S. Sakaguchi. 2013. Development and maintenance of regulatory T cells. *Immunity.* 38:414-423.
- Ombrello, M.J., E.F. Remmers, G. Sun, A.F. Freeman, S. Datta, P. Torabi-Parizi, N. Subramanian, T.D. Bunney, R.W. Baxendale, M.S. Martins, N. Romberg, H. Komarow, I. Aksentijevich, H.S. Kim, J. Ho, G. Cruse, M.Y. Jung, A.M. Gilfillan, D.D. Metcalfe, C. Nelson, M. O'Brien, L. Wisch, K. Stone, D.C. Douek, C. Gandhi, A.A. Wanderer, H. Lee, S.F. Nelson, K.V. Shianna, E.T. Cirulli, D.B. Goldstein, E.O. Long, S. Moir, E. Meffre, S.M. Holland, D.L. Kastner, M. Katan, H.M. Hoffman, and J.D. Milner. 2012. Cold urticaria, immunodeficiency, and autoimmunity related to PLCG2 deletions. *N Engl J Med.* 366:330-338.
- Owen, R. 1998. *Helicobacter*-species classification and identification. *Br Med Bull.* 54:17-30.
- Packard, T.A., and J.C. Cambier. 2013. B lymphocyte antigen receptor signaling: initiation, amplification, and regulation. *F1000prime reports.* 5:40.
- Parsonnet, J., G.D. Friedman, D.P. Vandersteen, Y. Chang, J.H. Vogelstein, N. Orentreich, and R.K. Sibley. 1991. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *The New England journal of medicine.* 325:1127-1131.
- Parsonnet, J., and P.G. Isaacson. 2004. Bacterial infection and MALT lymphoma. *The New England journal of medicine.* 350:213-215.
- Paster, B.J., A. Lee, J.G. Fox, F.E. Dewhirst, L.A. Tordoff, G.J. Fraser, J.L. O'Rourke, N.S. Taylor, and R. Ferrero. 1991. Phylogeny of *Helicobacter felis* sp. nov., *Helicobacter mustelae*, and related bacteria. *Int J Syst Bacteriol.* 41:31-38.
- Petro, J.B., and W.N. Khan. 2001. Phospholipase C-gamma 2 couples Bruton's tyrosine kinase to the NF-kappaB signaling pathway in B lymphocytes. *The Journal of biological chemistry.* 276:1715-1719.
- Piccirillo, C.A., and E.M. Shevach. 2004. Naturally-occurring CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Seminars in immunology.* 16:81-88.
- Pinotti, G., E. Zucca, E. Roggero, A. Pascarella, F. Bertoni, A. Savio, E. Savio, C. Capella, E. Pedrinis, P. Saletti, E. Morandi, G. Santandrea, and F. Cavalli. 1997. Clinical features, treatment and outcome in a series of 93 patients with low-grade gastric MALT lymphoma. *Leukemia & lymphoma.* 26:527-537.
- Posselt, G., S. Backert, and S. Wessler. 2013. The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell communication and signaling : CCS.* 11:77.
- Rad, R., L. Brenner, S. Bauer, S. Schwendy, L. Layland, C.P. da Costa, W. Reindl, A. Dossumbekova, M. Friedrich, D. Saur, H. Wagner, R.M. Schmid, and C. Prinz. 2006. CD25+/Foxp3+ T cells regulate gastric inflammation and *Helicobacter pylori* colonization in vivo. *Gastroenterology.* 131:525-537.

- Radaszkiewicz, T., B. Dragosics, and P. Bauer. 1992. Gastrointestinal malignant lymphomas of the mucosa-associated lymphoid tissue: factors relevant to prognosis. *Gastroenterology*. 102:1628-1638.
- Raghavan, S., M. Fredriksson, A.M. Svennerholm, J. Holmgren, and E. Suri-Payer. 2003. Absence of CD4+CD25+ regulatory T cells is associated with a loss of regulation leading to increased pathology in *Helicobacter pylori*-infected mice. *Clinical and experimental immunology*. 132:393-400.
- Raghavan, S., and J. Holmgren. 2005. CD4+CD25+ suppressor T cells regulate pathogen induced inflammation and disease. *FEMS immunology and medical microbiology*. 44:121-127.
- Raghavan, S., and M. Quiding-Jarbrink. 2012. Immune modulation by regulatory T cells in *Helicobacter pylori*-associated diseases. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets*. 12:71-85.
- Rieder, G., W. Fischer, and R. Haas. 2005. Interaction of *Helicobacter pylori* with host cells: function of secreted and translocated molecules. *Current opinion in microbiology*. 8:67-73.
- Rollinson, S., A.P. Levene, F.K. Mensah, P.L. Roddam, J.M. Allan, T.C. Diss, E. Roman, A. Jack, K. MacLennan, M.F. Dixon, and G.J. Morgan. 2003. Gastric marginal zone lymphoma is associated with polymorphisms in genes involved in inflammatory response and antioxidative capacity. *Blood*. 102:1007-1011.
- Roncarolo, M.G., S. Gregori, M. Battaglia, R. Bacchetta, K. Fleischhauer, and M.K. Levings. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological reviews*. 212:28-50.
- Rothenbacher, D., G. Bode, G. Berg, U. Knayer, T. Gonser, G. Adler, and H. Brenner. 1999. *Helicobacter pylori* among preschool children and their parents: evidence of parent-child transmission. *The Journal of infectious diseases*. 179:398-402.
- Rothman, N., C.F. Skibola, S.S. Wang, G. Morgan, Q. Lan, M.T. Smith, J.J. Spinelli, E. Willett, S. De Sanjose, P. Cocco, S.I. Berndt, P. Brennan, A. Brooks-Wilson, S. Wacholder, N. Becker, P. Hartge, T. Zheng, E. Roman, E.A. Holly, P. Boffetta, B. Armstrong, W. Cozen, M. Linet, F.X. Bosch, M.G. Ennas, T.R. Holford, R.P. Gallagher, S. Rollinson, P.M. Bracci, J.R. Cerhan, D. Whitby, P.S. Moore, B. Leaderer, A. Lai, C. Spink, S. Davis, R. Bosch, A. Scarpa, Y. Zhang, R.K. Severson, M. Yeager, S. Chanock, and A. Nieters. 2006. Genetic variation in TNF and IL10 and risk of non-Hodgkin lymphoma: a report from the InterLymph Consortium. *Lancet Oncol*. 7:27-38.
- Rudi, J., D. Kuck, A. Rudy, A. Sieg, M. Maiwald, and W. Stremmel. 2000. *Helicobacter pylori* vacA genotypes and cagA gene in a series of 383 H. pylori-positive patients. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*. 38:559-564.
- Sagaert, X., C. De Wolf-Peeters, H. Noels, and M. Baens. 2007. The pathogenesis of MALT lymphomas: where do we stand? *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.* 21:389-396.
- Sagaert, X., E. Van Cutsem, G. De Hertogh, K. Geboes, and T. Tousseyn. 2010. Gastric MALT lymphoma: a model of chronic inflammation-induced tumor development. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*. 7:336-346.
- Sakagami, T., M. Dixon, J. O'Rourke, R. Howlett, F. Alderuccio, J. Vella, T. Shimoyama, and A. Lee. 1996. Atrophic gastric changes in both *Helicobacter felis* and *Helicobacter pylori* infected mice are host dependent and separate from antral gastritis. *Gut*. 39:639-648.
- Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology*. 6:345-352.

- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, J. Shimizu, S. Yamazaki, T. Sakihama, M. Itoh, Y. Kuniyasu, T. Nomura, M. Toda, and T. Takahashi. 2001. Immunologic tolerance maintained by CD25+ CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunological reviews*. 182:18-32.
- Sakaguchi, S., K. Wing, and T. Yamaguchi. 2009. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. *European journal of immunology*. 39:2331-2336.
- Sakai, R., H. Kanamori, and Y. Ishigatsubo. 2005. [Long-term remission after CHOP therapy in a case of multifocal extranodal diffuse large B-cell lymphoma with t(1 ; 14) (p22 ; q32) and rearrangement of bcl-10]. [*Rinsho ketsueki*] *The Japanese journal of clinical hematology*. 46:1105-1108.
- Sarigul, M., V. Yazisiz, C.I. Bassorgun, M. Ulker, A.B. Avci, F. Erbasan, T. Gelen, R.M. Gorczynski, and E. Terzioglu. 2010. The numbers of Foxp3 + Treg cells are positively correlated with higher grade of infiltration at the salivary glands in primary Sjogren's syndrome. *Lupus*. 19:138-145.
- Scharenberg, A.M., L.A. Humphries, and D.J. Rawlings. 2007. Calcium signalling and cell-fate choice in B cells. *Nature reviews. Immunology*. 7:778-789.
- Schmausser, B., M. Eck, A. Greiner, M. Kraus, and H.K. Muller-Hermelink. 2000. Mucosal humoral immune response to CagA shows a high prevalence in patients with gastric MALT-type lymphoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 436:115-118.
- Skibola, C.F., J.D. Curry, and A. Nieters. 2007. Genetic susceptibility to lymphoma. *Haematologica*. 92:960-969.
- Smet, A., B. Flahou, I. Mukhopadhyay, R. Ducatelle, F. Pasmans, F. Haesebrouck, and G.L. Hold. 2011. The other Helicobacters. *Helicobacter*. 16:70-75.
- Snapper, C.M., F.D. Finkelmann, D. Stefany, D.H. Conrad, and W.E. Paul. 1988. IL-4 induces co-expression of intrinsic membrane IgG1 and IgE by murine B Cells stimulated with lipopolysaccharide. *J Immunol*. 141:489-498.
- Sommer, F., G. Faller, P. Konturek, T. Kirchner, E.G. Hahn, J. Zeus, M. Röllinghoff, and M. Lohoff. 1998. Antrum- and corpus mucosa-infiltrating CD4(+) lymphocytes in Helicobacter pylori gastritis display a Th1 phenotype. *Infect Immun*. 66:5543-5546.
- Stagg, J., and M.J. Smyth. 2010. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene*. 29:5346-5358.
- Stein, J. 2006. Molekulare Mikrobiologie und Immunpathogenese von Helicobacter pylori. Infektiologie des Gastrointestinaltraktes [W.F. Caspary, M. Kist, J. Stein, editors]. *Heidelberg: Springer Medizin Verlag*:151-157.
- Stein, M., R. Rappuoli, and A. Covacci. 2000. Tyrosine phosphorylation of the Helicobacter pylori CagA antigen after cag-driven host cell translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:1263-1268.
- Stolte, M. 1992. Helicobacter pylori gastritis and gastric MALT-lymphoma. *Lancet*. 339:745-746.
- Stolte, M., E. Bayerdörffer, A. Morgner, B. Alpen, T. Wündisch, C. Thiede, and A. Neubauer. 2002. Helicobacter and gastric MALT lymphoma. *Gut*. 50:19-24.
- Stolte, M., and S. Eidt. 1989. Lymphoid follicles in antral mucosa: immune response to Campylobacter pylori? *Journal of clinical pathology*. 42:1269-1271.
- Stolte, M., and S. Eidt. 1993. Healing gastric MALT lymphomas by eradicating H pylori? *Lancet*. 342:568.
- Stolte, M., O. Stadelmann, B. Bethke, and G. Burkard. 1995. Relationships between the degree of Helicobacter pylori colonisation and the degree and activity of gastritis,

- surface epithelial degeneration and mucus secretion. *Zeitschrift für Gastroenterologie*. 33:89-93.
- Su, B., P.J. Ceponis, and P.M. Sherman. 2003. Cytoskeletal rearrangements in gastric epithelial cells in response to *Helicobacter pylori* infection. *J Med Microbiol*. 52:861-867.
- Suerbaum, S., and P. Michetti. 2002. *Helicobacter pylori* infection. *The New England journal of medicine*. 347:1175-1186.
- Suh, P.-G., J.-I. Park, L. Manzoli, L. Cocco, J.C. Peak, M. Katan, K. Fukami, T. Kataoka, S. Yun, and S.H. Ryu. 2008. Multiple roles of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *BMB Reports*. 41:415-434.
- Thiede, C., T. Wundisch, B. Alpen, B. Neubauer, A. Morgner, M. Schmitz, G. Ehninger, M. Stolte, E. Bayerdorffer, and A. Neubauer. 2001. Long-term persistence of monoclonal B cells after cure of *Helicobacter pylori* infection and complete histologic remission in gastric mucosa-associated lymphoid tissue B-cell lymphoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 19:1600-1609.
- Thome, M. 2004. CARMA1, BCL-10 and MALT1 in lymphocyte development and activation. *Nature reviews. Immunology*. 4:348-359.
- Ullrich, A., W. Fischbach, and M. Blettner. 2002. Incidence of gastric B-cell lymphomas: a population-based study in Germany. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 13:1120-1127.
- Uren, A.G., K. O'Rourke, L.A. Aravind, M.T. Pisabarro, S. Seshagiri, E.V. Koonin, and V.M. Dixit. 2000. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Molecular cell*. 6:961-967.
- Valencia, X., and P.E. Lipsky. 2007. CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells in autoimmune diseases. *Nature clinical practice. Rheumatology*. 3:619-626.
- van Amelsfort, J.M., K.M. Jacobs, J.W. Bijlsma, F.P. Lafeber, and L.S. Taams. 2004. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in rheumatoid arthritis: differences in the presence, phenotype, and function between peripheral blood and synovial fluid. *Arthritis and rheumatism*. 50:2775-2785.
- Vandenbroucke-Grauls, C.M., and B.J. Appelmek. 1998. *Helicobacter pylori* LPS: molecular mimicry with the host and role in autoimmunity. *Italian journal of gastroenterology and hepatology*. 30 Suppl 3:S259-260.
- Viala, J., C. Chaput, I.G. Boneca, A. Cardona, S.E. Girardin, A.P. Moran, R. Athman, S. Memet, M.R. Huerre, A.J. Coyle, P.S. DiStefano, P.J. Sansonetti, A. Labigne, J. Bertin, D.J. Philpott, and R.L. Ferrero. 2004. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nature immunology*. 5:1166-1174.
- Vignali, D.A., L.W. Collison, and C.J. Workman. 2008. How regulatory T cells work. *Nature reviews. Immunology*. 8:523-532.
- von Boehmer, H. 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nature immunology*. 6:338-344.
- Wang, D., J. Feng, R. Wen, J.C. Marine, M.Y. Sangster, E. Parganas, A. Hoffmeyer, C.W. Jackson, J.L. Cleveland, P.J. Murray, and J.N. Ihle. 2000. Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity*. 13:25-35.
- Wang, Y., Y. Ma, Y. Fang, S. Wu, L. Liu, D. Fu, and X. Shen. 2012. Regulatory T cell: a protection for tumour cells. *Journal of cellular and molecular medicine*. 16:425-436.
- Willis, T.G., D.M. Jadayel, M.Q. Du, H. Peng, A.R. Perry, M. Abdul-Rauf, H. Price, L. Karran, O. Majekodunmi, I. Wlodarska, L. Pan, T. Crook, R. Hamoudi, P.G. Isaacson, and M.J.

- Dyer. 1999. Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell*. 96:35-45.
- Wilson, K.T., and J.E. Crabtree. 2007. Immunology of *Helicobacter pylori*: insights into the failure of the immune response and perspectives on vaccine studies. *Gastroenterology*. 133:288-308.
- Wing, K., and S. Sakaguchi. 2010. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nature immunology*. 11:7-13.
- Wotherspoon, A.C., C. Doglioni, T.C. Diss, L. Pan, A. Moschini, M. de Boni, and P.G. Isaacson. 1993. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *Lancet*. 342:575-577.
- Wotherspoon, A.C., C. Ortiz-Hidalgo, M.R. Falzon, and P.G. Isaacson. 1991. *Helicobacter pylori*-associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet*. 338:1175-1176.
- Wotherspoon, A.C., G.N. Soosay, T.C. Diss, and P.G. Isaacson. 1990. Low-grade primary B-cell lymphoma of the lung. An immunohistochemical, molecular, and cytogenetic study of a single case. *American journal of clinical pathology*. 94:655-660.
- Wu, M.S., L.T. Chen, C.T. Shun, S.P. Huang, H.M. Chiu, H.P. Wang, M.T. Lin, A.L. Cheng, and J.T. Lin. 2004. Promoter polymorphisms of tumor necrosis factor- α are associated with risk of gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 110:695-700.
- Wündisch, T., P. Dieckhoff, B. Greene, C. Thiede, C. Wilhelm, M. Stolte, and A. Neubauer. 2012. Second cancers and residual disease in patients treated for gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma by *Helicobacter pylori* eradication and followed for 10 years. *Gastroenterology*. 143:936-942.
- Wündisch, T., C. Thiede, A. Morgner, A. Dempfle, A. Günther, H. Liu, H. Ye, M.Q. Du, T.D. Kim, E. Bayerdörffer, M. Stolte, and A. Neubauer. 2005. Long-term follow-up of gastric MALT lymphoma after *Helicobacter pylori* eradication. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 23:8018-8024.
- Wyatt, J.I., and B.J. Rathbone. 1988. Immune response of the gastric mucosa to *Campylobacter pylori*. *Scandinavian journal of gastroenterology. Supplement*. 142:44-49.
- Xystrakis, E., S.E. Boswell, and C.M. Hawrylowicz. 2006. T regulatory cells and the control of allergic disease. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2:121-133.
- Yamaguchi, T., J.B. Wing, and S. Sakaguchi. 2011. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Seminars in immunology*. 23:424-430.
- Yan, B., S. Ye, G. Chen, M. Kuang, N. Shen, and S. Chen. 2008. Dysfunctional CD4⁺, CD25⁺ regulatory T cells in untreated active systemic lupus erythematosus secondary to interferon- α -producing antigen-presenting cells. *Arthritis and rheumatism*. 58:801-812.
- Yoshida, A., H. Isomoto, J. Hisatsune, M. Nakayama, Y. Nakashima, K. Matsushima, Y. Mizuta, T. Hayashi, Y. Yamaoka, T. Azuma, J. Moss, T. Hirayama, and S. Kohno. 2009. Enhanced expression of CCL20 in human *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Clin Immunol*. 130:290-297.
- Young, R.M., and L.M. Staudt. 2013. Targeting pathological B cell receptor signalling in lymphoid malignancies. *Nature reviews. Drug discovery*. 12:229-243.
- Yu, P., R. Constien, N. Dear, M. Katan, P. Hanke, T.D. Bunney, S. Kunder, L. Quintanilla-Martinez, U. Huffstadt, A. Schroder, N.P. Jones, T. Peters, H. Fuchs, M.H. de Angelis,

- M. Nehls, J. Grosse, P. Wabnitz, T.P. Meyer, K. Yasuda, M. Schiemann, C. Schneider-Fresenius, W. Jagla, A. Russ, A. Popp, M. Josephs, A. Marquardt, J. Laufs, C. Schmittwolf, H. Wagner, K. Pfeffer, and G.C. Mudde. 2005. Autoimmunity and inflammation due to a gain-of-function mutation in phospholipase C gamma 2 that specifically increases external Ca²⁺ entry. *Immunity*. 22:451-465.
- Zhang, Q., R. Siebert, M. Yan, B. Hinzmann, X. Cui, L. Xue, K.M. Rakestraw, C.W. Naeve, G. Beckmann, D.D. Weisenburger, W.G. Sanger, H. Nowotny, M. Vesely, E. Callet-Bauchu, G. Salles, V.M. Dixit, A. Rosenthal, B. Schlegelberger, and S.W. Morris. 1999. Inactivating mutations and overexpression of BCL10, a caspase recruitment domain-containing gene, in MALT lymphoma with t(1;14)(p22;q32). *Nature genetics*. 22:63-68.
- Zhao, D.M., A.M. Thornton, R.J. DiPaolo, and E.M. Shevach. 2006. Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*. 107:3925-3932.

8. Anhang

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Baff 1	Baff-R 2	April 3	Taci 4	Bcma 5	Plcg2 6	Sykb 7	Btk 8	Prkcb 9	Rela 10	Nfkb2 11	Hras1 12
B	Kras 13	Nras 14	Bcl6 15	Ccl1 16	Ccl11 17	Ccl12 18	Ccl17 19	Ccl19 20	Ccl2 21	Ccl20 22	Ccl22 23	Ccl24 24
C	Ccl25 25	Ccl3 26	Ccl4 27	Ccl5 28	Ccl7 29	Ccl8 30	Ccr1 31	Ccr2 32	Ccr3 33	Ccr4 34	Ccr7 35	Cd40 36
D	Cd40lg 37	Cebpb 38	Csf1 39	Cxcl1 40	Cxcl10 41	Cxcl11 42	Cxcl2 43	Cxcl3 44	Cxcl5 45	Cxcl9 46	Cxcr4 47	Fasl 48
E	Flt3l 49	Fos 50	Hdac4 51	Ifng 52	Il10 53	Il10rb 54	Il18 55	Il1a 56	Il1b 57	Il1f10 58	Il1r1 59	Il22 60
F	Il23r 61	Il6 62	Il7 63	Il2 64	Il4 65	Cxcr1 66	Cxcr2 67	Il9 68	Lta 69	Ltb 70	Ly96 71	Myd88 72
G	Nfatc3 73	Nfkb1 74	Nos2 75	Nr3c1 76	Tlr1 77	Tlr2 78	Tlr3 79	Tlr4 80	Tlr5 81	Tlr6 82	Tlr7 83	Tlr9 84
H	Tnf 85	Tnfsf 14 86	Hsp90a b1 87	S100a8 88	Cd80 89	Cd86 90	Cd53 91	Gapdh 92	Actb 93	MGDC 94	RTC 95	PPC 96

Abbildung 17: Layout des RT² Profiler Array (96 Well-Platte).



Abbildung 18: *Plcg2*-Nukleotidsequenz.

In der oberen Wildtyp *Plcg2* Sequenz ist eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym *HincII* vorhanden. Die Punktmutation in den *Plcg2*^{Ali5/Alis} Mäusen (untere Sequenz) entsteht durch Austausch der Purinbase Adenin zu Guanin (rosa gekennzeichnet). Somit ist eine Spaltung durch *HincII* nicht mehr möglich. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Yu (Institut für Immunologie, BMFZ, Marburg) zu Verfügung gestellt.

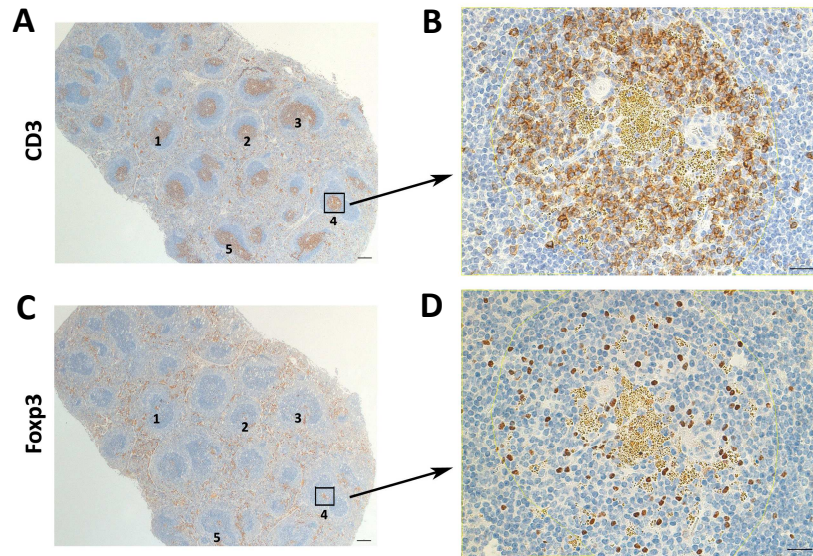


Abbildung 19: Immunhistologische CD3 und Foxp3 Färbung von murinem Milzgewebe.

Repräsentatives Beispiel einer (A-B) CD3 und (C-D) Foxp3 Färbung von Milzgewebe einer uninfizierten Maus. Die fünf gleichen T-Zell Areale (in der CD3 und Foxp3 Färbung) der weißen Pulpa wurden mikroskopisch festgelegt und die totale Anzahl von Foxp3⁺ Tregs in 40-facher Vergrößerung bestimmt. Mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms ImageJ v1.47 wurde das CD3⁺ T-Zell Areal kalkuliert (dünne gelbe Linie). Die Anzahl Foxp3⁺ Tregs konnte somit schließlich auf 1000 µm² des CD3⁺ T-Zell Areals bezogen werden. (A, C) Maßstabsleiste von 200 µm mit einer Vergrößerung von x 2,5 oder (B, D) 20 µm mit einer Vergrößerung von x 40.

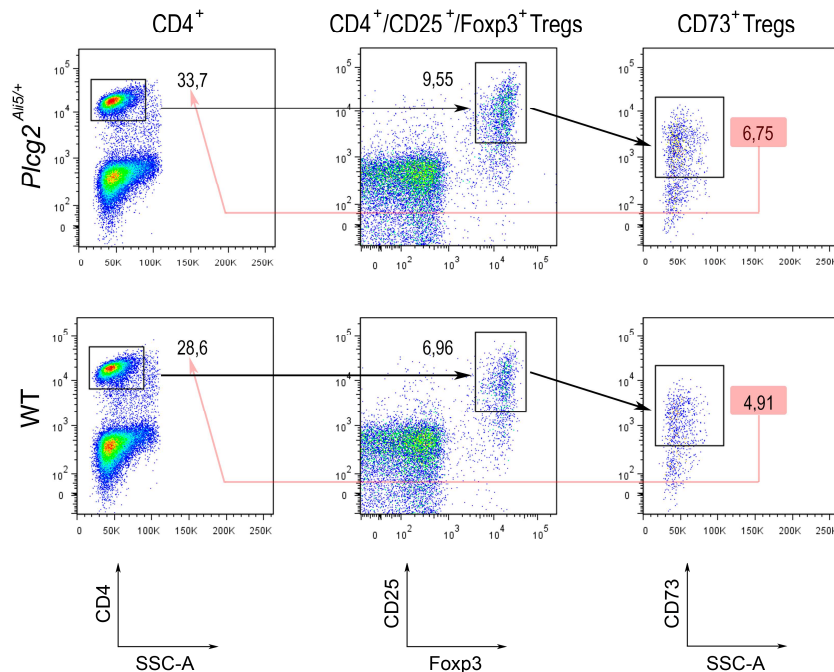


Abbildung 20: FACS Analyse von CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ Tregs und CD73⁺ Tregs der Milz.

Repräsentatives Beispiel einer CD4⁺/CD25⁺/Foxp3⁺ Treg und CD73⁺ Treg FACS-Analyse von jeweils einer Maus jeden Genotyps. Prozentualer Anteil ist bezogen auf alle CD4⁺ T-Zellen.

Tabelle 18: Vergleich der PCR Array und qPCR Daten im Genotyp- und Infektionsstatus.

Gen	Status	Experiment	Fold Regulation	p-Wert
Tnfrsf13c	Infektion	PCR Array	-1,8483	0,013 (two-way ANOVA)
				0,004 (t-Test)
		quantitative PCR	-2,349	0,036 (t-Test)
	Genotyp	PCR Array	-2,786	0,00015 (two-way ANOVA)
				0,014 (t-Test)
		quantitative PCR	-2,266	0,046 (t-Test)
S100a8	Genotyp	PCR Array	2,614	0,003 (two-way ANOVA)
				0,014 (t-Test)
		quantitative PCR	3,418	0,018 (t-Test)

9. Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Veröffentlichungen:

1. Goßmann, J., Stolte, M., Lohoff, M., Yu, P., Moll, R., Finkernagel, F., Garn, H., Brendel, C., Bittner, A., Neubauer, A. and Huynh, M.Q. A gain-of-function mutation in the *Plcg2* gene protects mice from *Helicobacter felis*-induced gastric MALT lymphoma. *Plos One* (under revision).
2. Huynh, M.Q., Goßmann, J., Gattenloehner, S., Klapper, W., Wacker, H.H., Ramaswamy, A., Bittner, A., Kaiser, U., Neubauer, A. (2015) Expression and pro-survival function of phospholipase C γ 2 in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*. 56 (4):1088-1095.
3. Sohlbach, K., Moll, R., Goßmann, J., Nowak, O., Barth, P., Neubauer, A., Huynh, M.Q. (2012) β -Catenin signaling: no relevance in Hodgkin lymphoma? *Leukemia & Lymphoma*. 53 (5):996-998.

Kongressbeiträge:

J. Goßmann, M. Huynh, A. Neubauer. 2011. Role of proinflammatory genes for the induction of gastric MALT lymphomas. Joint meeting of the SFB-TR17 'Ras-dependent pathways in human cancer' with the LOEWE Research Cluster 'Tumor and Inflammation'. 10.-13.04.2011 Rothenburg ob der Tauber. Posterpräsentation.

M. Huynh, J. Goßmann, M. Lohoff, P. Yu, R. Moll, F. Finkernagel, H. Garn, C. Brendel, A. Bittner, A. Neubauer. 2015. Eine aktivierende Mutation im *Plcg2*-Gen schützt Mäuse vor *Helicobacter felis*-induziertem gastralen MALT Lymphom. Jahrestagung DGHO. 09.-13.10.2015 Basel, Schweiz. Posterpräsentation.

10. Tabellarischer Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde vor dem endgültigen Druck entfernt.

11. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg:

Bauer, Garn, Lohoff, Moll, Neubauer, Yu

in Kulmbach:

Stolte

in Mainz:

Bartsch, Becker, Beetz, Biesterfeld, Buhl, Decker, Dorn, Dräger, Efferth, Espinola-Klein, Fahrenholz, Hankeln, Heil, Kadereit, Kaina, Konerding, Köpke, Krämer, Kurzig-Dumke, Lackner, Lieb, Lüddens, Markl, Martens, Neurath, Paulsen, Rittner, Schild, Schmidt, Schopf, Schuh, Seufert, Spessert, Stassen, Stöcker, Strand, Technau, Torzewski, Unden, Urban, von Landenberg, Wegener, Windoffer, Wölfel, Wolfrum

12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt und begleitet haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Neubauer für die mir gegebene Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Institut anzufertigen. Vielen Dank für die Unterstützung und die vielen wertvollen Anregungen während der Durchführung dieser Dissertation.

Ein besonderer Dank geht an meinen Betreuer Dr. Minh Huynh, der mir vom ersten Tag an mit Rat und Tat zur Seite stand und ohne dessen Hilfe diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen wäre. Danke!

Herrn Prof. Dr. R. Moll sowie Viktoria Wischmann (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH) danke ich für die Kooperation und die Übernahme und Fertigstellung der histologischen Präparate.

Ein großer Dank geht an Prof. Dr. M. Stolte (Klinikum Kulmbach), der viele Stunden opferte und Unmengen histologischer Magenpräparate befundete.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. M. Lohoff (Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Philipps-Universität Marburg) und Dr. P. Yu (Institut für Immunologie, Philipps-Universität Marburg) für die Kooperation und die hilfreichen Diskussionen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie (Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH) danke ich für die Durchführung der Kleintier Magnetresonanztomographie.

Mein Dank gilt ebenso Florian Finkernagel (Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung, Marburg) für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Weiterhin möchte ich mich bei dem gesamten Laborteam für das angenehme Arbeitsklima und die stete Hilfsbereitschaft bedanken. Ein großes Dankeschön geht dabei an Alwina Bittner für ihre Hilfe bei der Zucht und Genotypisierung der vielen Mäuse sowie den tierexperimentellen Versuchen. Dr. C. Brendel und Gavin Giel danke ich für die Übernahme der Mäuse.

Ein weiteres Dankeschön gilt meinen Freunden, die so oft ein offenes Ohr für mich hatten und durch die nötige Abwechslung mich immer wieder mit „Energie“ versorgten. Danke für die schöne und lustige Zeit in und außerhalb Marburgs!

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für die vielen aufbauenden Worte, den nötigen Rückhalt und das Vertrauen in mich. Mein größter Dank gilt dabei Christoph und Vincent. Danke, dass ihr immer für mich da seid!

13. Ehrenwörtliche Erklärung

Die ehrenwörtliche Erklärung wurde vor dem endgültigen Druck entfernt.